アブシシン酸受容体の構造に基づく植物の 乾燥ストレス応答制御の理解

宮川 拓也, 田之倉 優

アブシシン酸(ABA)は、植物が乾燥などのストレスに適応する際に主要な役割を果たしている。近年、植物の START タンパク質ファミリーである PYR/PYL/RCAR が ABA 受容体として同定され、ABA シグナル伝達経路の制御機構が解明された。ABA 非存在下では脱リン酸化酵素(PP2C)によりリン酸化酵素(SnRK2)が不活性化されており、ABA が存在すると PYR/PYL/PCAR が PP2C と結合して SnRK2 の不活性化を解除し、SnRK2 が応答を開始する。ABA の結合は、PYR/PYL/RCAR の機能変換領域にあたるループの構造変化を誘導し、閉じた構造に安定化したループは PP2C の活性調節に機能する。こうした分子機構に加えて、本稿では、シロイヌナズナの 14 種類の PYR/PYL/RCAR の機能的多様性とその構造基盤を概説し、個々の受容体を選択的に活性化して植物の ABA 応答を制御するための最近のアプローチを紹介する。

1. アブシシン酸を介する植物の乾燥ストレス応答

植物は根を下ろした環境で生長しなければならないた め、その生活環において遭遇する環境変化に順応するため のさまざまな仕組みを備えている. とりわけ、陸生植物は 水辺から大陸内部へと生育範囲を拡大する進化の過程で. 大地から水分を吸収するために根を発達させ、降雨のない 天候が続く際には水分の蒸散を防ぎ、細胞組織の乾燥を防 ぐための仕組みを獲得し発達させてきた. その仕組みの一 つは、内在性の低分子化合物であるアブシシン酸(abscisic acid: ABA) をメッセンジャーとする乾燥ストレス応答機 構である. ABA は植物の生活環において重要な役割を果 たす植物ホルモンの一つであり、主に根や葉において、ピ ルビン酸とグルタルアルデヒド3-リン酸を出発物質とし た非メバロン酸経路でカロテノイドを経由して生合成され る. ABA は2種類の鏡像異性体をとりうるが、生合成さ れるのは (+)-ABA のみである (図1). 根における ABA の濃度は、土壌や根の含水量とよく関連づけられる1.2.

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻(〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

Understanding of the regulation of plant drought-stress responses based on the structures of abscisic acid receptors Takuya Miyakawa and Masaru Tanokura (Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi 1–1–1, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8657, Japan)

ABA 量の増加は、気孔の閉鎖を誘導するだけでなく、水 分の約9割を失う種子の成熟や発芽抑制(種子の休眠状態)も引き起こすことから、植物における ABA の主要な 機能は、水分バランスと浸透圧変化に対する細胞の保護機 能を調節することといえる³.

植物が乾燥ストレスを感じる、すなわち根や葉において 浸透圧変化を感知すると, 上述した生合成経路により ABA が合成され、細胞膜に局在する ABA トランスポー ターを介して ABA が細胞内に輸送され蓄積する(**図**2)^{4.5)}. この ABA の蓄積によって起こる細胞応答を仲介するシグ ナル伝達(以降, ABA シグナル伝達)の負の制御因子と して、1990年代半ばに、タンパク質脱リン酸化酵素 2C (type 2C protein phosphatase: PP2C) が、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) の ABA 非感受性 abi 1-1 変異株な どの遺伝的スクリーニングにより同定された6.シロイヌ ナズナのゲノムには多数の PP2C ファミリーに属するタン パク質がコードされており、そのアミノ酸配列の特徴から 10 グループに分類されている. その中で, ABA シグナル 伝達に関わる PP2C はグループ A に分類され⁷,遺伝的ス クリーニングで最初に同定された ABA insensitive 1(ABI1) および ABI2 をはじめ、homology to ABI1 (HAB1) や HAB 2などの9種類がシロイヌナズナに存在する.

一方、PP2C の発見は ABA シグナル伝達の実体がタンパク質のリン酸化カスケードであることを強く示唆し、その後のタンパク質リン酸化酵素に着目した解析から、ABA により活性化されるタンパク質リン酸化酵素として sucrose non-fermenting-1(SNF1)-related protein kinase 2

(SnRK2) が同定された⁸. SnRK2 は ABA シグナル伝達の正の制御因子として機能し、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する。シロイヌナズナには 10 種類の SnRK2 が存在し、その活性化パターンにより三つのサブクラスに分類されている。サブクラスⅢに属する SnRK2. 2(SRK2D)、SnRK2. 3(SRK2I)、SnRK2. 6(SRK2E)は ABA により最も強く活性化され、これらの遺伝子をノックアウトしたシロイヌナズナ三重変異株では、ABA 応答性遺伝子の発現、気孔の開閉、種子の休眠などの多くの ABA 応答が失われる^{9.10}.

ABA シグナル伝達において PP2C が SnRK2 の上流で機能することは、ABA による SnRK2 の活性化が ABA 非感受性の abi1-1 変異株において損なわれることから示唆されていたが、SnRK2 と PP2C の直接的なつながりは、2009年になって二つの研究グループにより明らかにされた^{11,12)}. ABA による SnRK2 の活性化は、SnRK2 がその配列上のセリン残基またはトレオニン残基を自己リン酸化することで

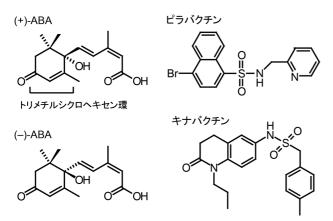


図1 ABA の2種類の立体異性体、ピラバクチンおよびキナバ クチンの構造式

起こる. タンパク質リン酸化酵素の活性化機構として,活性化ループの自己リン酸化がよく知られており, SnRK2 の活性化ループ上のセリン残基 (SnRK2.6では Ser175)の自己リン酸化は SnRK2 の活性化に必須である. PP2C は SnRK2 の C 末端配列と相互作用し,活性化ループ上のセリン残基を脱リン酸化することで SnRK2 を不活性化する.こうして, PP2C は ABA シグナル伝達の正の制御因子である SnRK2 の機能を抑制することにより, ABA シグナル伝達の負の制御因子として機能する.

ABA により活性化された SnRK2 は、細胞内のさまざま なタンパク質をリン酸化することによりその機能を調節 し、乾燥ストレスに対して恒常性を維持するための種々の 細胞応答を引き起こす(図2). 気孔の孔辺細胞において. SnRK2.6は細胞膜に局在する3種類の膜タンパク質をリ ン酸化することで機構の閉鎖を誘導する¹³⁾. slow anion channel-associated 1 (SLAC1) は気孔の開閉に応答する孔 辺細胞のアニオンチャンネルであり、SnRK2.6によって リン酸化されて活性化され、細胞内からの塩化物イオン (CI⁻) の流出を促進して気孔の閉鎖を導く. potassium channel in Arabidopsis thaliana 1(KAT1)は細胞内へのカ リウムイオン(K⁺)の取り込みにより気孔の開口を誘導 する K⁺チャンネルであり、SnRK2.6によるリン酸化は KAT1のチャンネル機能を阻害する. また、SnRK2.6は、 ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: NADPH) 酸化酵素で ある respiratory burst oxidase homolog protein F (RbohF) を リン酸化して活性化する. RbohF は孔辺細胞における ABA シグナル伝達のセカンドメッセンジャーである活性 酸素種(reactive oxygen species:ROS)を産生し、カルシ ウムイオン(Ca²⁺) チャンネルの活性化を介して細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることで気孔の閉鎖を導く. 一方, 活

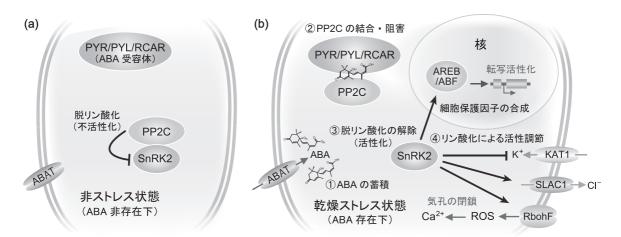


図2 ABA シグナル伝達の模式図

(a) 非ストレス状態(ABA 非存在下)において、PP2C は SnRK2 を結合して脱リン酸化する。これにより SnRK2 は自己リン酸化状態を保持できず不活性化している。(b) ①乾燥ストレス時に ABA トランスポーター(ABAT)を介して細胞内に ABA が蓄積する。② PYR/PYL/RCAR(ABA 受容体)は ABA の結合を介して PP2C と相互作用し、PP2C の脱リン酸化活性を阻害する。③ PP2C による阻害を解除された SnRK2 は自己リン酸化によって活性化する。④活性化した SnRK2 は、AREB/ABF、SLAC1、KAT1、RbohF などをリン酸化してそれらの機能を調節し、乾燥ストレスに対する細胞保護因子の合成促進や気孔の閉鎖を誘導する。

性化した SnRK2 は核内でも機能し、そのリン酸化の標的として ABA-responsive element(ABRE)binding(AREB)/ABRE-binding factor(ABF)転写因子が知られている.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 応答性の遺伝子群の転写を促進する¹⁴⁾. 転写活性化された遺伝子には、細胞内の高分子物質を保護する late embryo genesis-abundant(LEA)タンパク質、適合溶質であるプロリンや糖の合成酵素がコードされており、細胞の保湿機能を高めるための一群のタンパク質が合成され機能する.こうして、ABA は最終的に SnRK2 の活性化を引き起こし、孔辺細胞のイオンチャンネルなどを介した気孔閉鎖の早い応答と AREB/ABF 転写因子による遺伝子の転写活性化の遅い応答を組み合わせて、植物に乾燥ストレスに対する耐性を付与する.

化石調査に基づいて、最初の陸生植物は約4億7千万年から5億年前のオルドビス紀に生息していたと考えられている¹⁵⁾. これまでに述べたPP2CやSnRK2などのABAシグナル伝達の制御因子は、ほかの植物ホルモンのオーキシンやエチレンなどのシグナル伝達因子とは異なり、陸生植物においてのみ保存されている¹⁶⁾. このことはABAシグナル伝達系の獲得が植物の陸生化において決定的な役割を果たしたことを示唆している. さらに、分子系統解析やトランスクリプトーム解析のデータは、植物がABAシグナル伝達に関連する遺伝子を重複させ拡張させることにより、高度に複雑化したストレス耐性機構を進化の過程で発達させてきたことを示唆している¹⁷⁾.

2. ABA 受容体

1) ABA 受容体の探索

ABAによる植物の細胞応答とABAシグナル伝達経路の構成因子であるPP2CおよびSnRK2の解析に加えて、ABAを結合しシグナル伝達の起点となる受容体タンパク質の同定が試みられてきた. 植物細胞におけるABAの作用点, すなわち結合部位は, 細胞膜と細胞質の両方に存在することが示唆されており, ABA結合性タンパク質は, 細胞内小器官である葉緑体の外包膜と細胞膜から早期に同定されている.

マグネシウムプロトポルフィリンIXキレーターゼ(Mg^{2+} キレーターゼ)は葉緑体の外包膜に局在し、クロロフィル合成過程において、プロトポルフィリンIXへの Mg^{2+} の挿入を触媒する酵素である。 Mg^{2+} キレーターゼのIHサブユニット(IH subunit of the chloroplast IH Mg^{2+} -chelatase:IH Chlip はソラマメ(IH Mg^{2+} -chelatase:IH Chlip が IH Chlip に IH

として残されていたが、2010年に Shang らは、細胞内の高い ABA 濃度下において、WRKY 転写因子ファミリーのWRKY40が ChIHの C 末端細胞質領域と相互作用することを報告した²⁰⁾. WRKY40は、低い ABA 濃度下で、ChIHから離れてゲノム DNA 上の W-box シスエレメント配列に結合し、ABA 応答性遺伝子の活性化に働く AREB/ABF 転写因子の ABI5 などの転写を阻害する。こうして、ChIHが ABA 濃度依存的に ABA 応答性遺伝子の転写を活性化する仕組みが提案されている。しかしながら、シロイヌナズナの wrky40 変異株において ABI5 の発現上昇が観測されないことなどの矛盾する結果が報告されているため²¹⁾、ABA 応答における ChIH と WRKY40 の正確な機能については、さらなる検証が必要である。

細胞膜の ABA 結合性タンパク質として、G タンパク質 共役受容体(G-protein coupled receptor:GPCR)に属する G-protein coupled receptor 2 (GCR2) および GPCR-type G protein 1 (GTG1), GTG2 が同定されている. GCR2 は 7 回 膜貫通型の GPCR であると予測されており,シロイヌナ ズナにおける唯一の三量体Gタンパク質のGαサブユ ニット GPA1 と相互作用し、種子発芽の抑制、気孔の閉 鎖,ABA 応答性遺伝子の発現などの ABA により調節され る生理応答に関与する22). しかしながら、シロイヌナズナ の gcr2 変異株において ABA 応答性は失われず²³. GCR2 の ABA 結合性についても議論の余地があるため²⁴, GCR2 が ABA 受容体として機能するかは不明である. 一方. GTG1 および GTG2 は、GTP 結合能と GTP 加水分解活性 を持つ GPCR であり、GTP 結合型よりも GDP 結合型にお いて ABA を強く結合することが示されている²⁵. 最近, Kharenko らは、酵母を用いて発現したリコンビナントの GTG1 を用いて ABA の濃度依存的な結合を解析し、GTG1 に対する ABA の解離定数 (K_d) が 80 nM であることを報 告した²⁶⁾.実際に,シロイヌナズナの gtg 1/gtg 2 二重変異 株は、種子発芽の抑制や気孔閉鎖における ABA 感受性の 低下を示すが、ABA 応答は完全には失われない²⁴.この ことは、GTG1 および GTG2 とは異なる ABA の作用点が 存在することを示唆する.

2) 細胞内 ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR の発見

モデル植物における従来の遺伝学的解析は、1960年代に ABA が発見されて以来、ABA 受容体の探索に適用されてきたが、ABA 受容体の決定的な証拠にはつながらなかった.一方、Park らは、ABA と同様に種子の発芽阻害剤として機能するピラバクチン(pyrabactin、図 1)を用いた化学遺伝学的アプローチにより、ピラバクチンに対して非感受性の変異株を同定し、pyrabactin resistance 1(PYR1)がピラバクチンの生理作用にとって必要不可欠な因子であることを明らかにした 27 . しかしながら、ピラバクチンとABA による種子の転写応答は高い相関性(r=0.98)を示すが、ピラバクチンに対して非感受性を示す PYR1 機能欠失型変異株(pyr1 変異株)では、ABA により誘導される

種子の発芽抑制などの表現型は失われなかった。Park らはさらに、ピラバクチンおよび ABA の存在下で PYR1 と相互作用する因子を酵母ツーハイブリッド法で解析することにより、PYR1 が ABA シグナルの負の制御因子であるグループ A PP2C の ABI1、ABI2、HABI と相互作用することを見いだし、PP2C の脱リン酸化活性が ABA 依存的に PYR1 により阻害されることを明らかにした。

シロイヌナズナのゲノムには 13 種類の PYR1 ホモログ (PYR1-like 1~13: PYL1~13) がコードされている. 上述 したようにpyr1 変異株はABA に対して通常の応答を示 すが、pyr1/pyl1/pyl4 三重変異株およびpyr1/pyl1/pyl2/ pyl4 四重変異株では、種子の発芽抑制や SnRK2 の活性化 などの ABA に対する感受性が顕著に低下する²⁸⁾. このこ とは、複数の遺伝学的に重複した PYR1 および PYL1~13 が、ABA に対する応答に相補的に機能していることを示 唆している. Ma らは、独立に ABA 存在下で ABI2 と相互 作用する因子を酵母ツーハイブリッド法で解析し、PYL9 に相当する因子を同定して regulatory component of ABA receptor 1 (RCAR1) と名づけた (以降, PYR1 および PYL 1~13 を PYR/PYL/RCAR と総称する)²⁹⁾. 等温滴定カロリ メーターを用いた PYL9/RCAR1 の ABA 結合能の解析に よれば、PYL9/RCAR1は (+)-ABA を 660 nM の K_d で結 合する. 気孔の孔辺細胞における ABA 濃度は、乾燥スト レス時に nM オーダーから μM オーダーに上昇することが 観測されており³⁰⁾、PYL9/RCAR1 は ABA 応答に機能する のに適した ABA 結合能を持つと考えられる. また、PYL9/ RCAR1 の ABA 結合能は ABI2 存在下で 10 倍ほど $(K_d=64)$ nM) 高まり²⁹,同様の ABA 感受性の亢進が PYL5 と HAB1 においてもみられる³¹⁾. このことは、PP2C との相互作用 が PYR/PYL/RCAR への ABA の結合を安定化し、PYR/ PYL/RCAR と PP2C による協奏的な ABA 結合機構の存在 を示唆する.

これまで概説したように、PYR/PYL/RCAR は、ABA をその生理的濃度で結合する能力を持つだけでなく, ABA の結合を介して ABA シグナル伝達経路の構成因子で ある PP2C の活性を阻害する. このことは、PYR/PYL/ RCAR が ABA 受容体として機能し、PYR/PYL/RCAR、 PP2C、SnRK2 が二重の阻害・脱阻害機構により ABA シ グナル伝達経路を制御するモデルを提案する (図2). 非 ストレス条件下において、PP2C は下流の SnRK2 の自己リ ン酸化部位を脱リン酸化し、SnRK2を不活性化する. 一 方、植物に乾燥ストレスが加わると細胞内に蓄積した ABA を PYR/PYL/RCAR が結合し、PP2C と相互作用して その脱リン酸化活性を阻害する.これにより、SnRK2は PP2C による負の制御から解除され、自己リン酸化状態が 保たれて活性化し、ABA 応答性遺伝子の発現や気孔の閉 鎖に関わる標的タンパク質のリン酸化を促進して ABA 応 答を誘導する. 藤井らは、PYR1、ABI1、SnRK2.6 および ABA 応答性遺伝子のマスター転写因子である AREB1/ ABF2 を試験管内および植物のプロトプラストに再構成 し、実際に ABA の添加により AREB1/ABF のリン酸化が 誘導されることを証明した³²⁾. これは、PYR/PYL/RCAR、 PP2C、SnRK2 が ABA シグナル伝達経路の中心的な制御 因子であることを支持する.

3. ABA の作用機序

1) ABA の受容機構

PYR/PYL/RCAR が ABA 受容体として機能するための 分子機構は、2009年に PYR1、PYL1、PYL2 の結晶構造が 報告され,その詳細が明らかにされた^{33~37)}. PYR/PYL/ RCAR は、七つの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三つのαヘリックスを 持ち, START [steroidogenic acute regulatory (STAR) proteinrelated lipid transfer] ドメイン・スーパーファミリーに属 するタンパク質(START タンパク質)に共通したヘリッ クス-グリップ・フォールドを形成している. START タン パク質のフォールドは, βシートと C 末端の α ヘリック スの間にポケットを形成することが特徴であり、このポ ケットにさまざまな種類の疎水性の低分子リガンドを結合 する. これまでに、いくつかの START タンパク質がシグ ナル分子の受容体として機能する可能性が示唆されていた が³⁸⁾、PYR/PYL/RCAR は実際に細胞内シグナル伝達にお ける受容体として、また酵素活性の調節因子として機能す ることが証明された唯一の START タンパク質である.

PYR/PYL/RCAR と ABA の複合体の結晶構造において, ABA は PYR/PYL/RCAR のリガンド結合ポケットに結合 しており、ポケットの入口は ABA が通過できないほどに 狭まっている³³. ABA はそのカルボキシ基をリガンド結 合ポケットの底に向けて配向し、トリメチルシクロヘキセ ン環が PYR/PYL/RCAR の分子表面に近い位置に配置す る (図1,3). ABA のカルボキシ基は保存されたリシン 残基 (PYL1 では Lys86) とイオンペアを形成し、ほかの 極性基を側鎖に持つ複数のアミノ酸残基との水分子を介し た水素結合ネットワークにより固定される. PYL1 Lys86 などの ABA のカルボキシ基の認識残基をアラニンに置換 した変異体では ABA の結合が検出されないことから、 ABA のカルボキシ基の認識は PYR/PYL/RCAR の ABA 受 容機構にとって必要不可欠な構造基盤であるといえる. 一 方、トリメチルシクロヘキセン環は、リガンド結合ポケッ トの入口付近のループや C 末端の α ヘリックスに位置す る多数の疎水性残基に取り囲まれ、疎水性相互作用や van der Waals 相互作用により固定される (図3).

PYR1 および PYL1 は、植物で生合成される ABA の天然立体異性体である (+)-ABA を結合し、PP2C との相互作用と PP2C に対する活性阻害を示す 27 . (+)-ABA に対する立体選択性は、PYL1 と (+)-ABA の複合体の結晶構造に基づいて説明できる(図 3) 7 . ABA のトリメチルシクロヘキセン環は不斉炭素を持ち、(-)-ABA はこの不斉炭素を中心としてモノメチル基とジメチル基の位置が反転し

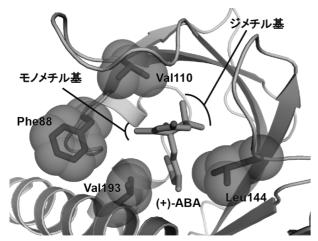


図3 PYL1の (+)-ABA 結合様式 PYL1の四つの疎水性残基により, (+)-ABAのトリメチルシクロヘキセン環のメチル基が配置するのに適した空間が形成される.

て (+)-ABA と鏡像関係になる. PYL1 のリガンド結合ポ ケットにおける (+)-ABA は、親水性残基との水分子を 介した水素結合ネットワークにより、カルボキシ基および 不斉炭素に結合したヒドロキシ基が固定される. (+)-ABA のモノメチル基は、PYL1 において三つの疎水性残基 (Phe88, Val110, Val193) が囲むように密接に認識する. このため、(-)-ABA が同じ様式で結合すると、空間占有 体積の大きなジメチル基が Phe88、Val110、Val193 との間 で立体障害を生じると考えられる.一方、PYL2、PYL3、 PYL4 などの PYR/PYL/RCAR は、(-)-ABA を結合でき ることが知られており²⁷⁾、PYR/PYL/RCAR の種類により トリメチルシクロヘキセン環を認識する疎水性残基が異な る可能性が示唆される. 最近, Zhang らは, PYL3 と (-)-ABA の複合体の結晶構造, および (+)-ABA に対して高 い選択性を持つPYL9と (+)-ABA の複合体の結晶構造 を比較解析し、ABA の立体選択性の構造基盤を報告し た³⁹⁾. PYL3 のリガンド結合ポケットにおいて. (+)-ABA のモノメチル基を認識する疎水性残基の側鎖は小さく, (-)-ABA のジメチル基を受け入れるのに十分な空間が存 在する. これに加えて、PYL3のIle82と (-)-ABAのジ メチル基との間で、結合に有利な疎水性相互作用が形成さ れる. これらは PYL1 において考察された立体選択性に関 する構造基盤を支持している.

2) ABA 受容による構造変化

オーキシン, ジベレリン, ジャスモン酸などのほかの植物ホルモンは, ABA と同様に分子内にカルボキシ基と疎水的な環構造を持つ. オーキシンおよびジャスモン酸の細胞内受容体(transport inhibitor response 1: TIR1 および coronatine insenstitive 1: COI1)はロイシンリッチ・リピート様のフォールドを持つ F-box タンパク質であり 40,41 , ジベレリンの細胞内受容体である gibberellin insensitive dwarf 1 (GID1)は触媒残基を欠失しているが α/β 加水分解酵素と

類似したフォールドを持つ40.これら受容体タンパク質の 構造は PYR/PYL/RCAR とはまったく異なり、リガンド 認識における詳細な構造基盤もそれぞれに特有のものであ る. しかしながら. 受容体タンパク質に対する植物ホルモ ンの結合様式には、ある共通性がうかがえる、それは、 ABA の結合様式と同様に、各植物ホルモンのカルボキシ 基がリガンド結合ポケットの底に向き、疎水的な環構造が 分子表面に配置するという特徴である. こうした受容体タ ンパク質における環構造の配置がシグナル伝達に重要な役 割を果たすことが、X線結晶構造解析により明らかになっ ている. オーキシンとジャスモン酸は、その受容体タンパ ク質の表面に疎水的な環構造を露出させることで、シグナ ル伝達に関わる標的タンパク質との相互作用の足場を提供 する40.41). これは、植物ホルモンがあたかも二つのタンパ ク質をくっつける "分子接着剤 (molecular glue)" として 機能すると表現される.一方、ジベレリンは、その疎水的 な環構造により GID1 の N 末端領域を誘引し、リガンド結 合ポケットに蓋をするように Ν 末端領域の α ヘリックス 形成を引き起こす42). この新たに形成された構造を用い て、GID1 はジベレリン依存的にシグナル伝達に関わる標 的タンパク質と相互作用するため、ジベレリンは"構造誘 導剤 (allosteric effector)"として機能すると表現される.

PYR/PYL/RCAR のアポ状態と ABA 結合状態の結晶構 造の比較解析によれば、ABA の結合が PYR/PYL/RCAR の構造変化を誘起する (図4)34~37). 構造変化は. "ゲート (門) ループ"および"ラッチ(掛け金) ループ"と名づ けられたリガンド結合ポケットの入口に位置する二つの ループにおいて観測される34). ゲートループ上のプロリン 残基(PYL1ではProl15)は、リガンド結合ポケットにお いて ABA のトリメチルシクロヘキセン環が作る疎水的な 環境に誘引されて、リガンド結合ポケットの入口をふさぐ ように変化する. また、ゲートループ上のセリン残基 (PYL1ではSer112) は、トリメチルシクロヘキセン環と の立体障害により、リガンド結合ポケットの外側に移動し て突き出した状態になる.一方,ラッチループについて は、ループ上のヒスチジン残基(PYL1では His142)の側 鎖がトリメチルシクロヘキセン環との相互作用を形成する ために、リガンド結合ポケットに向かって動く、その結 果、ゲートループとラッチループの主鎖間で新たに水素結 合が形成され、さらに ABA のトリメチルシクロヘキセン 環のカルボニル酸素と二つのループが水分子を介した水素 結合ネットワークを形成する.この ABA 結合によって誘 起されるループの構造変化は、次節で詳述するように PP2C との相互作用と活性阻害に重要な構造を提供する. このため、ABA はジベレリンと同様に"構造誘導剤"と して機能する植物ホルモンであるといえる.

3) ABA 依存的な PP2C の阻害機構

ABA が PYR/PYL/RCAR との結合を介して PP2C の脱リン酸化活性を阻害することは、ABA シグナル伝達のス

イッチをオンにし、植物に ABA 応答を誘導するための鍵 となるイベントである. ABA 存在下で PYL1 と ABI1 の複 合体および PYL2 と HAB1 の複合体の結晶構造が決定さ れ、PP2C に対する PYR/PYL/RCAR の ABA 依存的な作 用機序の詳細が明らかにされている (図 4) 33.34.37). PYR/ PYL/RCAR の PP2C との主要な相互作用面は、ABA の結 合に伴ってリガンド結合ポケットを閉じるように動いた二 つのループ (ゲートループおよびラッチループ) である. グループ A PP2C に保存された特徴的な配列は、二つのβ ストランドが逆並行に並んだ構造 (以降, β ヘアピンと呼 ぶ)を形成し、脱リン酸化活性の触媒ドメインから突き出 している. このβヘアピンがPYR/PYL/RCAR に対する PP2Cの主要な相互作用部位として機能し、PYR/PYL/ RCAR の閉じた二つのループおよび C 末端の α ヘリック スと接触する. とりわけ、βヘアピン上のトリプトファン 残基 (ABI1 では Trp300) は PYR/PYL/RCAR との相互作 用に重要であり、その側鎖はPYR/PYL/RCARの閉じた 二つのループの間に形成された細長い溝にはまり込み、イ ンドール環のイミノ基が ABA と PYR/PYL/RCAR の二つ のループにより捕捉された水分子とさらなる水素結合を形 成する(図4). 一方, βヘアピン上のアルギニン残基(ABI 1ではArg304) は、ゲートループのプロリン残基 (PYL1 では Prol15) を上から抑えつけるように接触する⁷. これ らの相互作用により PYR/PYL/RCAR の二つのループは 閉じた状態にさらに安定化されると考えられ、それを Melcher らは"ゲート-ラッチ-ロック機構(gate-latch-lock mechanism)"と名づけている³⁴⁾. PYL9/RCAR1のABA 結 合能が ABI2 存在下で 10 倍ほど高まることをすでに述べ たが、こうした PP2C 存在下での ABA に対する PYR/ PYL/RCAR の結合能の増強は、ABA を結合した PYR/ PYL/RCAR と PP2C の複合体構造で示された、PP2C によ るゲートループの安定化機構により解釈することができ

PYR/PYL/RCAR のゲートループは、ABA を結合した

閉じた状態において、上述したようにセリン残基 (PYL1 では Ser112) が位置する領域が突き出して配置する. こ の突き出た領域は、PP2Cとの複合体構造においてPP2C の活性部位に栓をするように挿入されている. ゲートルー プ上のセリン残基 (PYL1 では Ser112) は、PP2C の触媒 残基の一つであるグルタミン酸残基 (ABI1 では Glu142) と水素結合を形成し、ゲートループが PP2C の触媒部位で 安定化することに寄与する. こうして, ABA との接触に より構造変化したゲートループは、PP2Cとの相互作用だ けでなく、PP2Cの活性部位をふさぐことに機能し、PP2C の基質との接触を妨げる作用機序が提案されている. 一 方、ABA シグナル伝達経路の構成因子である PP2C の発 見をもたらした abi 1-1 変異体が ABA 非感受性の形質を示 す理由についても、PYL1と ABI1の複合体構造により説 明することができる³³⁾. abi1-1 変異体において, ABI1 の Glv180 はアスパラギン酸残基に置換されている. Glv180 は ABI1 の Glu142 の近傍に位置し、その主鎖のイミノ基 が PYL1 のゲートループ上の Ser112 と水素結合を形成す る. Gly180 が Asp に変異すると、PYL1 Ser112 などの ゲートループ上の残基との立体障害を生じるため、その結 果として PYL1 による ABA 依存的な ABI1 の阻害作用が 弱められると考えられる.

非ストレス条件下において、PP2C は SnRK2 を恒常的に 脱リン酸化しており、その PP2C の機能は PYR/PYL/RCAR により ABA 依存的に 阻害される。PYR/PYL/RCAR の作用機序は、これまでに述べた構造生物学的なアプローチにより解明されたが、Soon らはさらに、PP2C の一つである HAB1 と SnRK2.6 の複合体の結晶構造を決定し、PYR/PYL/RCAR が PP2C と SnRK2 の結合様式を模倣して ABA 依存的に PP2C を結合することを示した⁴³⁾. PP2C は ABA 非存在下では SnRK2 と結合しているが、ABA が存在する場合には、ABA と結合した PYR/PYL/RCAR が(SnRK2 を追い出して)SnRK2 の結合していた部位に結合する。PYR/PYL/RCAR の二つのループと相互

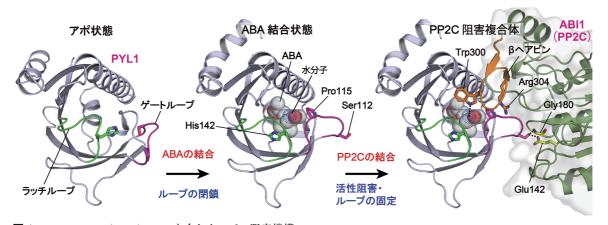


図 4 ABA の PYR/PYL/RCAR を介した PP2C 阻害機構 PYL1 のゲートループ(マゼンタ)とラッチループ(緑)は ABA の結合によって閉じた状態に安定化される. ABI1 (PP2C) の β ヘアピン上の Trp300 の側鎖は,PYL1 の閉じた二つのループの間に結合し,ABA および二つのループ によって捕捉された水分子(シアン)と水素結合(黒破線)を形成する.ゲートループ上の Ser112 は ABI1 の触媒 残基である Glu142 および Gly180 と水素結合を形成する.

作用する HAB1 のβヘアピン上のトリプトファン残基 (ABI1 では Trp300) は、HAB1 と SnRK2.6 の複合体構造 において SnRK2.6 の活性部位をふさぐように位置する. 一方、SnRK2.6 の自己リン酸化による活性化に重要な活性 化ループは、PYR/PYL/RCAR のゲートループと同様に、 HAB1 の活性部位に入り込むように位置する. この活性化 ループ上には、SnRK2.6の活性化に必須な自己リン酸化部 位の Ser175 が存在しているため、HAB1 は SnRK2.6 との 複合体形成を介して Ser175 の自己リン酸化を恒常的に阻 害する. また. PYR/PYL/RCAR のゲートループ上のセリ ン残基 (PYL1 では Ser112) と SnRK2.6 の Ser175 は、HAB1 の活性部位においてほぼ類似した位置に結合する. こうし て、PYR/PYL/RCAR は、ABA 依存的な相互作用を介し て、PP2C が SnRK2 の自己リン酸化を抑制するための主要 な二つの構造基盤を同時に抑え込む.この結果, SnRK2 は PP2C による不活性化から解除され、自己リン酸化が起 こり活性化される.

SnRK2 に対する PP2C の阻害濃度(IC₅₀)は 2~8 μM 程度であるが⁴³⁾, ABA 依存的な PYR/PYL/RCAR と PP2C の結合力はより強く, IC₅₀ で 30~300 nM である(図 5)⁴⁴⁾. また, PYR/PYL/RCAR と PP2C が ABA を介して複合体をいったん形成すると, ABA を含まない溶液中においても複合体が解離しないことが観測されており, 細胞内 ABA 濃度が低下した際に PYR/PYL/RCAR を介した ABA シグナルがどのように脱感作されるのかは不明である. この疑問に対して, 最近, CULLIN4-RINGE3 ユビキチンリガーゼの基質認識に関わる damaged-specific DNA binding protein 1 (DDB1)-associated 1 (DDA1) が, 種子発芽の抑制などの ABA 応答を負に制御する因子として機能し, PYL4, PYL8, PYL9 を結合してプロテアソームによる分解を促進

することが示された⁴⁵⁾. DDA1 による PYL8 のユビキチン 化は ABA により抑制されることから, PYL8 は低 ABA 濃度下でユビキチン-プロテアソーム系により分解されて制御されると考えられる. DDA1 は PYL4, PYL8, PYL9 を特異的に標的とするが, PYR/PYL/RCAR のユビキチン-プロテアソーム系による分解制御が, ABA 応答の脱感作の一つの分子機構として注目される.

4. ABA 受容体の多様性

1) 植物における機能的多様性

シロイヌナズナのゲノムにコードされている 14 種類の PYR/PYL/RCAR について、シロイヌナズナのプロトプラ ストにおける再構成実験が行われ、PYL13を除くほかの 13 種類の PYR/PYL/RCAR が ABA 受容体として機能し, ABA 応答性遺伝子の発現のための ABA シグナル伝達経路 を活性化することが示された32). PYL13 は ABA 結合に必 要なリシン残基(PYL1では Lys86)を欠失しているため、 ABA 結合性を持たないと考えられ、どの PP2C とも相互 作用は認められていない⁴⁶⁾. ほかの 13 種類の PYR/PYL/ RCAR はその物理化学的性質から二つのクラスに分類され る (図5). PYR1 および PYL1~PYL3 は ABA 依存的に ABI1, HAB1, HAB2 などの PP2C を阻害する⁴⁷⁾. 一方, PYL5、PYL6、PYL8~PYL10 は ABA 非存在下においても PP2C の阻害作用を示し、PYL4 については HAB2 のみを ABA 非依存的に阻害する40. PYL7, PYL11, PYL12の PP2C 阻害活性については調べられていないが、PYL4~ PYL12 は恒常的な PP2C の活性阻害に機能し、植物におけ る基底レベルの PP2C 活性の調節を担っている可能性があ る. ABA 依存性により分類される二つのクラスの PYR/

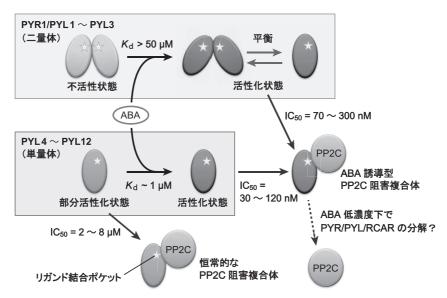


図5 2クラスの ABA 受容体の ABA 感受性および PP2C との複合体形成の違い 二量体を形成する PYR1/PYL1~PYL3 は ABA を結合することで PP2C との相互作 用が可能になる. 一方、単量体として存在する PYL4~PYL12 は PP2C と恒常的に 相互作用する. PYR/PYL/RCAR と PP2C の相互作用 (IC50) は ABA の結合によっ て強められる.

PYL/RCAR はまた、ABA に対する結合親和性においても違いがみられる。PYR1 および PYL1~PYL3 の (+)-ABA に対する K_a は 50 μ M 程度であるが $^{33.36.48}$ 、PYL4~PYL12 は K_a で約 1 μ M と相対的に高い親和性を持つ $^{31.48.49}$. こうした ABA 感受性の違いは、植物における ABA 応答の早い段階と遅い段階の時間的な制御にとって重要であるかもしれない。

ABA 依存的に活性化する PYR/PYL/RCAR のうち 3 種 類 (PYR1, PYL1, PYL2) を欠失した pyr1/pyl1/pyl2/pyl4 四重変異株では、RD29A、P5CS1、NCED3 などの主要な ABA 応答性遺伝子の発現、ABA により誘導される気孔の 閉鎖、SnRK2の活性化などが大きく損なわれており、 ABA 依存的に活性化する PYR/PYL/RCAR の植物におけ る機能的な重要性が示唆される20. 一方, シロイヌナズナ における PYL9 の過剰発現は種子の発芽抑制や気孔の閉鎖 に対する ABA 感受性を亢進し、RNAi による PYL9 の一 過的な抑制は ABA 依存的な転写応答の低下を引き起こ す²⁹⁾. また、シロイヌナズナにおける PYL5 と PYL8 の異 所的な発現は乾燥ストレスに対する耐性を強化する31.50). これらの知見は、ABA 非依存的な PYR/PYL/RCAR もま た、植物のストレス応答における ABA シグナル伝達の制 御に重要な ABA 受容体として機能することを示唆する. eFP Browser や Genevestigator などのトランスクリプトーム のデータベースによると、PYR/PYL/RCAR ファミリーの 各メンバーの遺伝子発現プロファイルはそれぞれ異なり. 各メンバーの配列相同性や ABA 応答性などによる傾向と は一致しない⁵¹⁾. したがって、PYR/PYL/RCARファミ リーの各メンバーが、植物において ABA シグナル伝達を 相補するように振る舞うだけでなく、それぞれが何か特別 な役割を果たしているかどうかは不明なままである. 前述 の DDA1 のように、PYL8 などの限られたメンバーに対し て相互作用する因子が報告されていることから、植物細胞 には個々のメンバーに対して特異的に機能する因子が存在 し、ABA 応答に関わるさまざまな細胞過程の調節に PYR/ PYL/RCAR ファミリーの多様性が役立っている可能性が ある.

ABA は乾燥などのストレス応答で機能するだけでなく、ほかの植物ホルモンとの相互作用を介しながら、種子の成熟と発芽、実生の発育、果実の成熟などの植物のさまざまな生育段階に関与しているため、農業的な応用面においてABA 応答の調節機構を理解することは重要である。ABA シグナル伝達経路の制御モデルはシロイヌナズナにおいて解明されてきたが、イネ、トマト、イチゴ、ブドウなどの農作物を中心に PYR/PYL/RCAR オルソログの機能解析例が近年報告された⁵²⁾. イネにおいては 10 種類の機能的な PYR/PYL/RCAR オルソログが存在し、その一つである OsPYL/RCAR5 の過剰発現は、イネの種子発芽の抑制などに対する ABA 感受性を亢進する。また、トマト(Solanum lycopersicum)の 8 種類の PYR/PYL/RCAR オルソログのうち、4 種類(SIPYL1、SIPYL2、SIPYL3、SIPYL6)は 果

実の発生と成熟に関わる主要な因子であり、それぞれが発生・成熟過程の異なる段階で高度に発現されて機能する。イチゴ(Fragaria ananassa)においても11種類のPYR/PYL/RCAR オルソログが存在するが、その中でFaPYR1が果実の成熟において主要な役割を果たしている。FaPYR1の発現低下は果実の成熟を遅らせるだけでなく、さまざまな ABA 応答性を変化させる。また、FaPYR1をRNAiで一過的に抑制すると果実は赤色を失い、ABA 処理によっても回復しない。一方、ブドウ(Vitis vinifera)では少なくとも7種類のPYR/PYL/RCAR オルソログが同定されており、VvRCAR6と VvRCAR5 は葉や根におけるABA 応答に関与する。このように、広範な種における解析がさらに進むことにより、植物におけるPYR/PYL/RCAR の時空間的な制御も含めた個々の役割の多様性に関する理解が深まるであろう。

2) 多様性の構造基盤

シロイヌナズナの PYR/PYL/RCAR は,ABA 感受性お よび PP2C に対する阻害作用の ABA 依存性に基づいて二 つのクラスに分類されるが、各クラスの機能的な違いを説 明する構造的な特徴が明らかにされている. 9種類の ABA 非依存的な PYR/PYL/RCAR のうち, 実際に解析さ れた PYL4~PYL6 および PYL8~PYL10 は単量体として 存在し、ABA 依存的な PP2C 阻害を示す PYR1 および PYL1~PYL3は、ABA の結合の有無によらずホモ二量体 を形成する (図 5)⁴⁷⁾. PYR1, PYL1, PYL2のホモ二量体 の相互作用面は、ゲートループと C 末端の α ヘリックス であり、これらの構造上に位置する疎水性残基間の相互作 用によってホモ二量体は安定化する. PYR/PYL/RCARへ の ABA の結合がゲートループの閉じた状態への構造変化 を誘起することから予想されるように、ホモ二量体の相互 作用面における疎水性残基の組み合わせが ABA の結合に より変化することで、ホモ二量体はプロトマー間の相対的 な配置を変化させる. しかしながら, X線小角散乱やゲル 濾過分析の結果によると、ABA 結合状態でもホモ二量体 は解離せず35.47), PP2C との相互作用面はホモ二量体の形成 に使われたままである. PYR1, PYL1, PYL2がABAの 結合を介して PP2C と 1:1 のヘテロ二量体を形成するた めには、これら受容体のホモ二量体形成の相互作用が ABA の結合に伴う配向変化により弱められる必要がある. ABA 非存在下における同様のホモ二量体形成は PYL3 に おいても観測されるが、PYL3の ABA 結合に伴う配向変 化はさらに劇的である53). ホモ二量体においてゲートルー プ間で接触している PYL3 の各プロトマーは、ABA の結 合により相対的に約 135°回転し、ゲートループとラッチ ループが大きく溶媒に露出する. このことは、ABA の結 合がホモ二量体の会合状態を変化させ PP2C との相互作用 を促進させることを明確に示している. PYR1 および PYL1~PYL3 が ABA に対して低い親和性 $(K_a > 50 \mu M)$ を 示すことは、これら PYR/PYL/RCAR がホモ二量体を形 成していることと関連し、ABA 結合によるプロトマーの再配向がエネルギー的に不利であることで説明される⁴⁸⁾.

ABA の結合によらず単量体をとる PYL4~PYL6 および PYL8~PYL10 は、PP2C に対して恒常的な阻害作用を示 すことが特徴である. これら受容体においてホモ二量体へ の会合が不安定化される理由は、PYL2と PYL10 の結晶構 造の比較に基づいて説明できる47. PYL2のホモ二量体の 相互作用面に位置するイソロイシン残基(Ile88)は、PYL10 においてリシン残基 (Lys80) に置換されている. PYL2 のホモ二量体は、プロトマー間で複数の疎水性残基からな る疎水性クラスターを形成することで安定化されており, この疎水性クラスターは PYL10 における Lys80 のような 極性残基により乱されることで、ホモ二量体への会合が抑 制されると考えられる. 実際に、PYL2のI88K変異体は 溶液中でホモ二量体を形成せず、ABA 非存在下において も PP2C に対する阻害作用を示す47). 同様に、単量体に解 離した PYR1 変異体もまた ABA の結合によらず PP2C の 活性を阻害することができる. Hao らはさらに、ABA 非 存在下で PYL10 と HAB1 の複合体の結晶構造を解析し、 PYL10のゲートループとラッチループが ABA を介して HAB1 と結合した PYL2 と同じコンホメーションをとるこ とを明らかにした47). このことは、ABA を結合していな い単量体のPYR/PYL/RCAR において、ゲートループと ラッチループが柔軟にコンホメーションを変化させ、誘導 適合により PP2C と相互作用することを示唆する. こうし て、PYR/PYL/RCAR のホモ二量体形成は、ゲートループ のコンホメーションを開いた状態に固定し、ABA 依存的 なシグナル伝達を厳密に制御することに寄与するであろ う. 単量体の PYR/PYL/RCAR は ABA 非存在下において も PP2C と相互作用できるが、PP2C に対する阻害活性は ABA の結合により明らかに強められる. これは、水分子 を介した ABA との水素結合ネットワークの形成が、PYR/ PYL/RCAR と PP2C の相互作用を強化し、PP2C の活性部 位にゲートループを適切かつ安定に導くことに寄与するた めと考えられる.

これまでに述べたように、PYR/PYL/RCAR のホモ二量体の相互作用面にあたる、ゲートループおよび C 末端の α ヘリックスが、ABA 感受性と PP2C に対する恒常的な活性を増強するための標的部位として有力である。 Mosquna らは、PYR1 の 39 残基に部位特異的な変異を導入してABA および PP2C との相互作用を解析し、PYR1 を活性化する変異がゲートループと C 末端の α ヘリックスに集中していることを確認した 50 . 1種類の残基の変異は PYR1を部分的にしか活性化しないが、H60P/V83F/F159V 三重変異体および H60P/V83F/M158I/F159V 四重変異体は、ABA を結合した PYR1 と同程度の活性を示す。これらの変異の導入は、PYR/PYL/RCAR のクラスに関わらず、すべての PYR/PYL/RCAR を活性化することから、in vivo における個々の PYR/PYL/RCAR の機能を選択的に探索するためのツールとして利用することができる。実際にこの

アプローチを適用して活性化された PYL2 は種子における ABA 応答を十分に誘導し、強い ABA 要求性を示す aba21 変異体の ABA 欠乏効果を抑制する⁵⁴.

5. ABA 受容体の化合物による制御

種子発芽アッセイにおいて PYR1 の ABA アゴニストと して同定されたピラバクチンは、エンドウマメ (Pisum sativum) の背軸表皮における気孔の閉鎖を誘導するが、乾 燥ストレスに対する ABA 応答には機能しない55). ABA が シロイヌナズナにおける PYL13 を除くほかのすべての PYR/PYL/RCAR と PP2C の相互作用を誘導するパンアゴ ニストであるのに対して、ピラバクチンのPYR/PYL/ RCAR への作用はかなり複雑である. ピラバクチンは, PYR1 および PYL1 の選択的なアゴニストとして働くが, PYL2と PYL4 に対してはアンタゴニストとして作用す る**
このような選択性のために、ピラバクチンは化学遺 伝学的解析による PYR1 の同定で大きな役割を果たした. ピラバクチンは PYR/PYL/RCAR の個々の生理的な役割 の解析に役立つとともに、その作用機序の理解は ABA シ グナル伝達を包括的に、またはより選択的に制御するため の新たなアゴニスト開発の助けとなる.

PYR1 および PYL1 がピラバクチンを結合した結晶構造 は、ピラバクチンがこれら受容体のリガンド結合ポケット に結合しアゴニストとして作用する仕組みを明らかにし た56~58). ピラバクチンは ABA と異なる化学構造を持つが (図1). ABA との結合に必須な相互作用の形成を模倣し て PYR1 および PYL1 に結合する (図 6a) 56.58 . ピラバクチ ンのピリジン環の窒素原子は、PYL1の Lys86 および Glu 171 などの ABA のカルボキシ基と相互作用する残基と水 分子を介した水素結合を形成する。また、PYL1のGlu121 はピラバクチンのスルホンアミドの NH と水素結合を形成 し、この NH は ABA の結合様式において ABA のヒドロ キシ基と水素結合を形成する水分子と空間的に同じ位置を 占める. 一方, ピラバクチンのナフタレン環は ABA のト リメチルシクロヘキセン環のアゴニスト機能を模倣し, ゲートループと疎水性相互作用により接触することでゲー トループを閉じた状態に安定化する(図6b). ピラバクチ ンを結合した PYL1 と ABI1 の複合体構造は、実際にピラ バクチンの結合がゲートループとラッチループを閉じた状 態に誘導し、PP2C との相互作用面を形成することを明ら かにした⁵⁶⁾.

一方、ピラバクチンの選択的なアンタゴニストとしての作用は、PYL2とピラバクチンの複合体の結晶構造により明らかにされた(図 6b) $^{56.57.59}$. ピラバクチンは、PYR1 および PYL1 のリガンド結合ポケットでの配向と比べて、 90° ないし 180° 回転した配向で PYL2 のリガンド結合ポケットに結合する。その結果として、ナフタレン環がゲートループから離れて位置することにより、ピラバクチンは PYL2 のゲートループの閉鎖を誘導できない。このピ

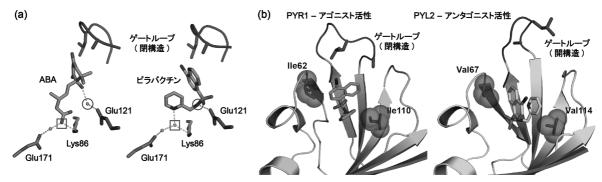


図6 ピラバクチンの選択的作用

(a) PYL1 に対する ABA およびピラバクチンの結合様式. 四角 (□) と円 (○) で示された水分子および化合物の原子はそれぞれ空間配置が一致している. (b) PYR/PYL/RCAR に対してピラバクチンがアゴニストまたはアンタゴニストとして機能するための結合の配向. ゲートループを閉構造に導くように結合したピラバクチンはアゴニストとして機能する.

ラバクチンの結合様式の違いは、PYR1と PYL2のリガン ド結合ポケットにおける二つの残基の違いによって説明さ れる^{57,59)}. PYR1 の Ile110 に相当する残基は PYL2 において バリン残基(Val114) に置換されている. PYL2 Val114の 側鎖はピラバクチンのピリジン環と接触しており、V114I への変異により側鎖が大きくなるとピリジン環との立体障 害が生じると考えられる.この立体障害を避けるために、 ピラバクチンは PYR1 のリガンド結合ポケットにおいて回 転する必要がある. さらに、PYR1の Ile62のδ位のメチ ル基はピラバクチンのナフタレン環と接触することによ り、アゴニストとしてゲートループを閉じた構造に誘導す ることに寄与する. 二つのアミノ酸残基を同時に相互置換 することにより、PYR1とPYL2のピラバクチンに対する 選択性は反転する.こうして、リガンド結合ポケットにお ける疎水性残基の配置は、ピラバクチンの選択的なアゴニ スト/アンタゴニスト活性に影響する.

これまでに述べた ABA およびピラバクチンの結合と PYR/PYL/RCAR の活性化に関する構造基盤は、PYR/ PYL/RCAR のアゴニストを合理的に設計するためのコン セプトを提供する. 設計した分子が実用的なアゴニストと して機能するためには、PYR/PYL/RCAR のリガンド結合 ポケットに高い親和性で結合する必要がある. それと同時 に、アゴニストには閉じた状態のゲートループと接触する のに十分な疎水性表面を提供することが要求される. 実際 に、ピラバクチンの構造に基づいたアゴニストの設計が試 みられ、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見いだされ た⁵⁶⁾. さらに最近, 岡本らにより, PYR1 および PYL1~ PYL3 (ホモ二量体型のPYR/PYL/RCAR) とPYL5を選 択的に活性化する新たなアゴニストとして、キナバクチン (quinabactin) というスルホンアミド化合物が示された(図 1)⁶⁰⁾. キナバクチンは、ABAよりも低濃度でPYR1と PYL1 を活性化し、in vivo において ABA と同様の効力を 持つ、シロイヌナズナにおいて、キナバクチンにより誘導 される遺伝子の発現パターンは ABA 処理により誘導され るパターンと高い相関性 (r=0.90) を示し、キナバクチ

ン処理は気孔の閉鎖を誘導して植物体の水分ロスを抑制する。このキナバクチンの作用により、シロイヌナズナとダイズにおいて、乾燥ストレスに対する耐性が亢進することが確認されている。以上の結果は、ホモ二量体型の PYR/ PYL/RCAR が植物体の ABA 応答にとって主要な役割を担っていることを示唆し、これら受容体に対する合成アゴニストを用いることで植物体の乾燥ストレス耐性が制御できることを証明している。

6. おわりに

ABA 受容体として PYR/PYL/RCAR が 2009 年に報告さ れてからこれまでに、ABA シグナル伝達の制御の中心と なる分子機構が PYR/PYL/RCAR を中心とした生化学・ 構造生物学的なアプローチにより次々と解明され、ABA 応答の研究は、合成化合物やタンパク質工学に基づく遺伝 子改変による PYR/PYL/RCAR の選択的な制御を通して, 植物の乾燥ストレス耐性を人為的に制御する応用段階に到 達した.一方、ABA はほかの植物ホルモンとの相互作用 を介して植物のさまざまな生長段階を制御しており, PYR/PYL/RCAR の個々の生理機能への関わりとその分子 機構については、まだ十分に理解されていない、そのた め、個々のメンバーが関与する細胞プロセスを解析するこ とが今後の重要な課題となる. 本稿で概説したPYR/ PYL/RCAR の選択的な制御と生化学・構造生物学的なア プローチは、ABA シグナル伝達における PYR/PYL/ RCAR の多様性とその分子機構のさらなる解明に役立つで あろう.

文 献

- 1) Zhang, J. & Davies, W. (1989) Plant Cell Environ., 12, 73-
- Thompson, A.J., Mulholland, B.J., Jackson, A.C., McKee, J.M., Hilton, H.W., Symonds, R.C., Sonneveld, T., Burbidge, A., Stevenson, P., & Taylor, I.B. (2007) Plant Cell Environ., 30, 67-78
- 3) Zhu, J.-K. (2002) Annu. Rev. Plant Biol., 53, 247–273.

- Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 2355–2360.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., & Shinozaki, K. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 2361–2366.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chefdor, F., & Giraudat, J. (1994) Science, 264, 1448–1452.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Plant Cell Physiol., 51, 1821–1839.
- 8) Li, J., Wang, X., Watson, M.B., & Assmann, S.M. (2000) *Science*, 287, 300–303.
- Fujii H. & Zhu, J. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 8380–8385.
- 10) Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Plant Cell Physiol., 50, 2123–2132.
- 11) Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 17588–17593.
- 12) Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, S., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P.L., Lauriere, C., & Merlot, S. (2009) Plant Cell, 21, 3170–3184.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., & Dobrowolska, G. (2011) OMICS, 15, 859–872.
- 14) Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 1988–1993.
- Rubinstein, C.V., Gerrienne, P., de la Puente, G.S., Astini, R.
 A., & Steemans, P. (2010) New Phytol., 188, 365–369.
- Hauser, F. Waadt, R., & Schroeder, J.I. (2011) Curr. Biol., 21, R346–R355.
- Hanada, K. Hase, T., Toyoda, T., Shinozaki, K., & Okamoto, M. (2011) J. Plant Res., 124, 455–465.
- 18) Zhang, D.-P., Wu, Z.-Y., Li, X.-Y., & Zhao, Z.-X. (2002) Plant Physiol., 128, 714–725.
- Mochizuki, N., Brusslan, J.A., Larkin, R., Nagatani, A., & Chory, J. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 2053–2058.
- 20) Shang, Y., Yan, L., Liu, Z.-Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., Wu, F.-Q., Wang, X.-F., Du, S.-Y., Jiang, T., Zhang, X.-F., Zhao, R., Sun, H.-L., Liu, R., Yu, Y.-T., & Zhang, D.-P. (2010) Plant Cell, 22, 1909–1935.
- 21) Chen, H., Lai, Z., Shi, J., Xiao, Y., Chen, Z., & Xu, X. (2010) BMC Plant Biol., 10, 281.
- 22) Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., & Ma, L. (2007) Science, 315, 1712–1716.
- 23) Gao, Y., Zeng, Q., Guo, J., Cheng, J., Ellis, B.E., & Chen, J.-G. (2007) Plant J., 52, 1001–1013.
- 24) Risk, J.M., Day, C.L., & Macknight, R.C. (2009) Plant Physiol., 150, 6–11.
- Pandey, S., Nelson, D.C., & Assmann, S.M. (2009) Cell, 136, 136–148.
- 26) Kharenko, O.A., Choudhary, P., & Loewen, M.C. (2013) Plant Physiol. Biochem., 68, 32–36.
- 27) 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) Science, 324, 1068–1071.
- 28) 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) Plant J., 61, 290-299.
- 29) Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009) Science, 324, 1064–1068.
- Harris, M.J. Outlaw, W.H., Mertens, R., & Weiler, E.W. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2584–2588.
- 31) Santiago, J. Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.-Y., Márquez, J.A., Cutler, S.R., & Rodriguez, P.L. (2009) *Plant J.*, 60, 575–588.
- 32) Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., & Zhu, J.K. (2009) *Nature*, 462, 660–664.
- 33) Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.-J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K.-S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Tanokura, M. (2009) *Nature*, 462, 609–614.
- 34) Melcher, K., Ng, L.-M., Zhou, X.-E., Soon, F.-F., Xu, Y., Su-ino-Powell, K.M., Park, S.-Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F. C., Jensen, D.R., Yong, E.-L., Volkman, B.F., Cutler, S.R., Zhu, J.-K., & Xu, H.E. (2009) Nature, 462, 602–608.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A.S., Rambo, R.P., Hitomi, C., Cutler, S.R., Schroeder, J.I., & Getzoff, E.D. (2009) Science, 326, 1373–1379.
- 36) Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.-Y., Jamin, M., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., & Márquez, J.A. (2009) *Nature*, 462, 665–668.
- 37) Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J., & Yan, N. (2009) Nat. Struct. Mol. Biol., 16, 1230–1236.
- Ponting, C.P. & Aravind, L. (1999) Trends Biochem. Sci., 24, 130–132.
- 39) Zhang, X., Jiang, L., Wang, G., Yu, L., Zhang, Q., Xin, Q., Wu, W., Gong, Z., & Chen, Z. (2013) PloS ONE, 8, e67477.
- 40) Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., & Zheng, N. (2007) *Nature*, 446, 640–645.
- 41) Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browse, J., He, S.-Y., Rizo, J., Howe, G.A., & Zheng, N. (2010) *Nature*, 448, 400–405.
- 42) Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.-P., & Hakoshima, T. (2008) Nature, 456, 459–463.
- 43) Soon, F.-F., Ng, L.-M., Zhou, X.-E., West, G.-M., Kovach, A., Tan, M.-H., Suino-Powell, K.M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M. J., Brunzelle, J.S., Zhang, H., Yang, H., Jiang, H., Li, J., Yong, E.-L., Cutler, S., Zhu, J.-K., Griffin, P.R., Melcher, K., & Xu, H.E. (2011) Science, 335, 85–88.
- 44) Okamoto, M., Peterson, F.C., Defries, A., Park, S.-Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B.F., & Cutler, S.R. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 12132–12137.
- 45) Irigoyen, M.L., Iniesto, E., Rodriguez, L., Puga, M.I., Yanagawa, Y., Pick, E., Strickland, E., Paz-Ares, J., Wei, N., De Jaeger, G., Rodriguez, P.L., Deng, X.-W., & Rubio, V. (2014) Plant Cell, 26, 712–728.
- 46) Joshi-Saha, A., Valon, C., & Leung, J. (2011) *Mol. Plant*, 4, 562–580.
- 47) Hao, Q., Hao, Q., Yin, P., Li, W., Wang, L., Yan, C., Lin, Z., Wu, J.-Z., Wang, J., Yan, S.-F., & Yan, N. (2011) Mol. Cell., 42, 662–672.
- 48) Dupeux, F., Santiago, J., Betz, K., Twycross, J., Park, S.-Y., Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Jensen, M.R., Krasnogor, N., Blackledge, M., Holdsworth, M., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., & Márquez, J.A. (2011) EMBO J., 30, 4171– 4184.
- 49) Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F.F., Christmann, A., & Grill, E. (2010)

- Plant J., 61, 25-35.
- 50) Saavedra, X., Modrego, A., Rodríguez, D., González-García, M.P., Sanz, L., Nicolás, G., & Lorenzo, O. (2010) Plant Physiol., 152, 133–150.
- 51) Klingler, J.P., Batelli, G., & Zhu, J.-K. (2010) *J. Exp. Bot.*, 61, 3199–3210.
- 52) Ben-Ari, G. (2012) Plant Cell Rep., 31, 1357-1369.
- 53) Zhang, X., Zhang, Q., Xin, Q., Yu, L., Wang, Z., Wu, W., Jiang, L., Wang, G., Tian, W., Deng, Z., Wang, Y., Liu, Z., Long, J., Gong, Z., & Chen, Z. (2012) Structure, 20, 780–790
- 54) Mosquna, A. Peterson, F.C., Park, S.-Y., Lozano-Juste, J., Volkman, B.F., & Cutler, S.R. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 20838–20843.
- 55) Puli, M.R. & Raghavendra, A.S. (2012) J. Exp. Bot., 63, 1349–1356.

- 56) Melcher, K., Xu, Y., Ng, L.-M., Zhou, X.E., Soon, F.-F., Chinnusamy, V., Suino-Powell, K.M., Kovach, A., Tham, F.S., Cutler, S.R., Li, J., Yong, E.-L., Zhu, J.-K., & Xu, H.E. (2010) Nat. Struct. Mol. Biol., 17, 1102–1108.
- 57) Peterson, F.C., Burgie, E.S., Park, S.-Y., Jensen, D.R., Weiner, J.J., Bingman, C.A., Chang, C.-E., Cutler, S.R., Phillips, G.N. Jr, & Volkman, B.F. (2010) Nat. Struct. Mol. Biol., 17, 1109–1113
- 58) Hao, Q., Yin, P., Yan, C., Yuan, X., Li, W., Zhang, Z., Liu, L., Wang, J., & Yan, N. (2010) J. Biol. Chem., 285, 28946– 28952.
- 59) Yuan, X. Yin, P., Hao, Q., Yan, C., Wang, J., & Yan, N. (2010) J. Biol. Chem., 285, 28953–28958.
- Okamoto, M., Peterson, F.C., Defries, A., Park, S.-Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B.F., & Cutler, S.R. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 12132–12137.

著者寸描 ■

●宮川拓也(みやかわ たくや)

東京大学大学院農学生命科学研究科助教. 博士 (農学).

■略歷 1979 年群馬県に生る. 2002 年群馬大学工学部生物化学工学科卒業. 04 年同大学院工学研究科生物化学工学専攻修士課程修了. 07 年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修了. 同年 4 月博士研究員, 7 月特任助教. 10 年助教 (現職).

■研究テーマと抱負 植物のストレス応答や生長等の制御で中心的な役割を担うタンパク質を中心に、それらの立体構造に基づいて制御の仕組みを解明する研究をおこなっている。自ら取得した構造情報を、植物に有用な形質を付与するための薬剤設計や分子改変に役立てたい。

■趣味 スポーツ観戦.

●田之倉 優 (たのくら まさる)

東京大学大学院農学生命科学研究科教授. 理学博士.

■略歴 1974年東京大学理学部生物化学科卒業. 79年同大学院理学系研究科博士課程修了(理学博士). 80年大分医科大学医学部助手. 88年順天堂大学医学部講師. 89年東京大学理学部講師. 94年東京大学生物生産工学研究センター教授. 98年東京大学大学院農学生命科学研究科教授(現職).

■研究テーマと抱負 タンパク質の構造生物学, 老化の分子機構と抗老化食物質研究, 食品の丸ごと NMR 解析の 3 分野で研究を行っている. 現在はそれぞれの研究を進めるとともに, 融合した領域での研究と開発を目指している.

■ウェブサイト http://fesb.ch.a.u-tokyo.ac.jp/

■趣味 植物栽培.