

アブシジン酸受容とシグナル伝達機構の最前線

農業生物資源研究所 遺伝資源センター 放射線育種場
佐藤浩二 西村宜之

1. はじめに

植物ホルモンであるアブシジン酸 (Abscisic acid; ABA, 図-1A) は、カロテノイド由来のテルペノイドの一種で、種子の登熟や植物の形態形成など、栄養成長期から生殖成長期まで幅広い過程で作用する^{1,2)}。また、植物は環境ストレス (乾燥, 塩, 低温など) に曝されると、植物体内でABAが蓄積し、ABAによる気孔の閉鎖や環境ストレス応答に関わる遺伝子の発現が誘導されることから、ABAは環境ストレス応答における重要なシグナルとして知られている。ABAシグナル伝達の研究は、モデル植物であるシロイヌナズナを中心に、ABAの感受性に関わる突然変異体を用いた遺伝学的解析により、

多数のABAシグナル伝達因子が同定されてきた。しかし、ABA受容体は、遺伝学的解析では単離されず、ABA受容機構の解析は、他のホルモンに比べ、著しく遅れていた。2009年、新たなABA受容体としてPYRABACTIN RESISTANCE 1 (PYR) / PYR1-like (PYL) / REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (RCAR) が報告され、PYR/PYL/RCARと既知のABAシグナル伝達因子との関係も明らかになり、ABA受容からシグナル伝達機構の理解が急速に進んだ³⁻⁶⁾。特に、ABA受容体とABAシグナル伝達因子の結晶構造解析により、ABAの初期応答機構が原子レベルで明らかになった⁷⁻¹¹⁾。現在、ABAシグナル伝達は、1: ABA受容体PYR/PYL/RCAR, 2: タンパク質脱リン酸化酵素タイプ2C (PP2C), 3: タンパク質リン酸化酵素SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2 (SnRK2), 4: SnRK2により制御される標的因子の4つの構成要素が重要であると考えられている。本稿では、主要な4つのABAシグナル伝達因子を中心に最新の知見を含め解説する。

2. PP2C

ABAによる種子発芽の抑制や気孔の閉口応答において、ABA非感受性を示す優勢変異体として*abi1-1*と*abi2-1*は単離され、その原因

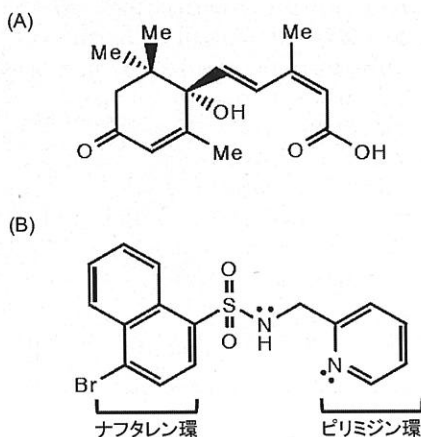


図-1 ABAとピラバクチンの構造
(A) (+)-ABA, (B) ピラバクチン

遺伝子は共にPP2Cであった。*abi1-1*変異体は、ABAによる細胞内の活性酸素種やCa²⁺濃度の上昇、OST1/SnRK2.6タンパク質リン酸化酵素やS型陰イオンチャネルの活性化が抑制されることから、ABI1はABAシグナル伝達経路の上流で働くことが示唆された^{1,2)}。シロイヌナズナは、約80個のPP2Cを持ち、そのうち9つのPP2C (ABI1, ABI2, HAB1, HAB2, AHG1, AHG3/PP2CA, HAI1, HAI2/AIP1, HAI3) がクラスターAに分類される。HAI1, HAI2, HAI3を除く6つのPP2C機能喪失変異体は、劣勢のABA高感受性を示し、*hai1hai2hai3*や他の組み合わせのPP2C多重変異体は、非常に強いABA高感受性になることから、クラスターAに属するPP2Cは機能重複し、ABAシグナルを負に制御すると考えられた^{1,2,12)}。

PP2Cの標的因子として、タンパク質リン酸化酵素、転写因子、クロマチンリモデリング因子、低分子量Gタンパク質、カリウムチャンネルなどが酵母2ハイブリット法の解析により同定された^{1,2,13)}。タンパク質リン酸化酵素として、Ca²⁺シグナルに依存しないSnRK2 (後述) とCa²⁺シグナルに依存するCIPK/SnRK3やCPK/CDPKがあり、タンパク質リン酸化—脱リン酸化はABAシグナル伝達において、重要なシグナル伝達の手段であることを意味する。また、PP2Cは転写因子やクロマチンリモデリング因子と相互作用することから、直接遺伝子発現の制御に関わっている可能性も考えられる。

3. SnRK2

ABAによる気孔の閉口応答が弱くなるABA非感受性*ost1*変異体の原因遺伝子は、タンパク質リン酸化酵素であるSnRK2の1つであるSnRK2.6であった。*ost1*変異体はCa²⁺の添加

による気孔の閉口応答は正常であることから、Ca²⁺シグナルを介さないABAシグナル伝達の初期応答に関わる因子と考えられた。シロイヌナズナは、10個のSnRK2 (SnRK2.1-2.10) 相同遺伝子を有し、3つのサブクラスに分類される。OST1/SnRK2.6が属するサブクラス3は、他にSnRK2.2, SnRK2.3があり、これらサブクラス3のSnRK2は、ABAや高浸透圧処理により短時間で活性化した^{1,2)}。*snrk2.2*と*snrk2.3*の機能喪失変異体は、ABA非感受性をほとんど示さないが、*snrk2.2snrk2.3*や*snrk2.2snrk2.3snrk2.6*の多重変異体は、種子発芽、根の伸長、気孔の閉口応答やABA誘導遺伝子の発現誘導において、顕著なABA非感受性を示した。ABI1など一部のPP2Cは、SnRK2と相互作用し、SnRK2の活性化ループを直接脱リン酸化することが報告された¹⁴⁾。さらに、*abi1-1*タンパク質も同様にSnRK2を脱リン酸化できることが明らかになり、*abi1-1*優勢変異はPP2Cの活性そのものを破壊する変異ではないと考えられた。これらのことから、サブクラス3のSnRK2は機能重複し、PP2Cにより活性化状態が制御されるABAシグナルの正の制御因子であることが明らかになった。

4. SnRK2の標的因子

サブクラス3に属するSnRK2 (SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6) は、ABAにより活性化することから、その標的因子は、SnRK2のリン酸化により機能が制御されると考えられる。ABAにより発現が誘導される遺伝子のプロモーター領域は、ABA responsive element (ABRE) 配列など、様々な転写因子が結合するシス配列を持つ。種子発芽において、ABA非感受性を示す*abi5*変異体は、ABRE配列に

結合するb-Zip型の転写因子が原因遺伝子であった^{1,2)}。ABRE配列に結合するタンパク質として、栄養成長期のABAシグナル伝達で働くABF2/AREB1とABF4/AREB2, ABF3が知られており、それらはABI5の相同遺伝子であった。ABF/AREBが機能を発揮するためには、SnRK2によるリン酸化が必要で、ABF2/AREB1はSnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6と相互作用し、それらによってリン酸化される。また、*areb1areb2abf3*の3重変異体で発現が抑制される遺伝子の多くは、*snrk2.2snrk2.3snrk2.6*の3重変異体においても発現が抑制された。これらのことから、SnRK2とABF/AREBは同じ制御系で働き、ABF/AREBはSnRK2の下流で働くことが示唆された^{1,2)}。

ABAによる気孔の閉口応答は、NADPH酸化酵素であるRbohFによる活性酸素種の生成、細胞膜カルシウムチャネルの活性化による細胞質内のCa²⁺濃度の上昇、陰イオンチャネルであるSLAC1の活性化による陰イオンの流出と、カリウムチャネルであるKAT1の不活化によるK⁺の流出により引き起こされ、孔辺細胞の浸透圧は低下し、気孔は閉じる。この一連の過程で鍵となっているRbohF, SLAC1とKAT1は、SnRK2により直接リン酸化され、それらの機能が制御されていることも報告された^{1,2)}。

5. PYR/PYL/RCAR

筆者らのグループを含め、ABA受容体候補として、PYR/PYL/RCARをコードする遺伝子群がいくつかの異なる手法で同定された³⁻⁶⁾。Cutlerらのグループは、ABAと類似した作用（アゴニスト）を示す化合物“ピラバクチン（図-1B）”を化合物ライブラリーから発見し、ピラバクチン耐性を示す*pyr1*変異体を単離し、

その原因遺伝子を同定したところ、PYR/PYL/RCARの1つであった⁵⁾。また、筆者らは質量分析装置を利用した手法を用い、ABI1の相互作用因子として同じ遺伝子を見出すことに成功した⁴⁾。PYR/PYL/RCARは、感染特異的タンパク質（PRタンパク質）のBet v1様のSTARTドメインタンパク質をコードし、決定された結晶構造の全体構造は、これらに属するタンパク質に良く似ていた。シロイヌナズナには14個のPYR/PYL/RCAR (PYR1, PYL1-13, 図-2) が存在しており、*pyr1*変異体はABA感受性が正常であったが、*pyr1pyl1pyl2pyl4*の4重変異体は、ABAによる種子発芽や根の伸長抑制、気孔の閉口応答などにおいて、非常に強いABA非感受性を示した^{4,5)}。このことから、ABA受容体が遺伝学的に同定されなかった原因は、機能重複であることが明らかになった。

PYR/PYL/RCARの組換えタンパク質は、ホモ2量体、または、単体で存在した^{7,15,16)}。興味深いことに、単体で存在するPYR/PYL/RCAR

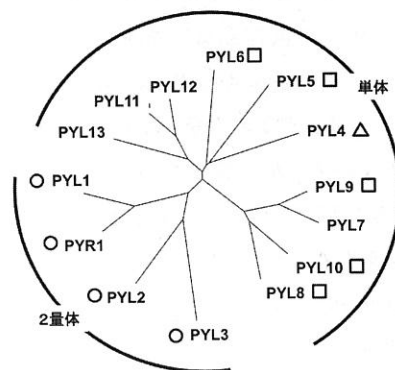


図-2 PYR/PYL/RCARの分子系統樹

PYR1, PYL1, PYL2, PYL3はホモ2量体を形成するが、それ以外は単体で存在する。○はABA依存的にPP2Cと結合するPYR/PYL/RCAR, □はABA非依存的にPP2Cと結合するPYR/PYL/RCAR, △はPP2CによりABA依存性が異なるPYR/PYL/RCARをそれぞれ表す。

の方が、ホモ2量体で存在するPYR/PYL/RCARよりABA結合能が高かった^{15,16)}。ホモ2量体を形成するPYR/PYL/RCARは、ABA依存的にPP2Cと相互作用し、ABAを結合した状態のPYR/PYL/RCARは、PP2C活性を阻害した^{5,16)}。一方、単体で存在するPYR/PYL/RCAR (PYL10を除く(後述))は、ABAの有無に関わらずPP2Cと相互作用していたが、ABAが結合していないPYR/PYL/RCARは、PP2C活性を阻害せず、ABAが結合した状態のPYR/PYL/

RCARでのみPP2C活性を阻害していた^{3,6,16)}。

PYR/PYL/RCARの発見により、長年の謎であったABA受容からシグナル伝達のメカニズムとabi1-1が優勢変異である原因が十分に明らかになった(図-3)。ABA非存在下では、PP2C活性はPYR/PYL/RCARによる抑制を受けない。そのため、PP2CはSnRK2の活性化ループを直接脱リン酸化し、不活性化するため、SnRK2の標的因子は活性化されずABA応答は起こらない。一方、ABA存在下では、PYR/

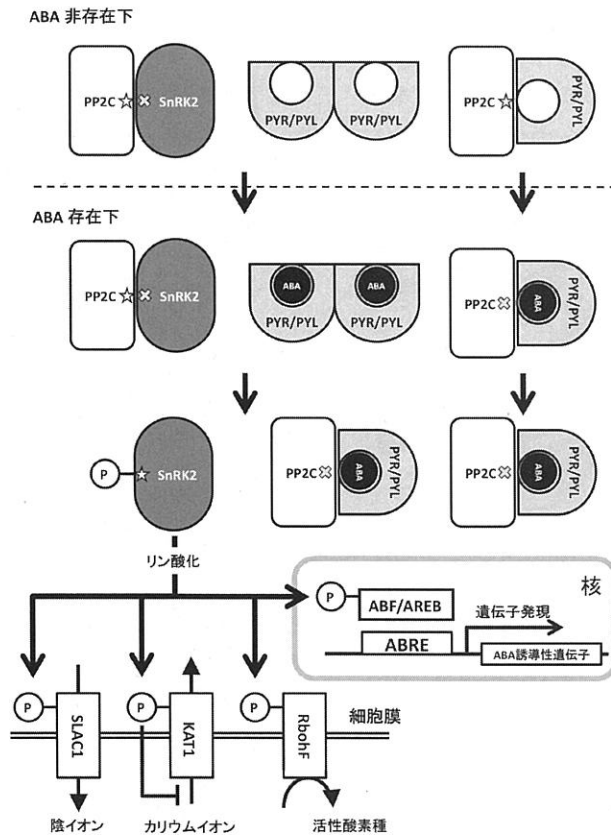


図-3 ABAシグナル伝達機構のモデル

ABA非存在下では、PYR/PYL/RCARは、ホモ2量体(左)、または、PP2Cとヘテロ2量体(右; PP2C活性は抑制されていない)を形成する。PP2CはSnRK2と互いの酵素活性部位が結合し、SnRK2の活性化を抑制することにより、植物はABA応答しない。PYR/PYL/RCARがABAと結合すると、PYR/PYL/RCARはPP2C活性を抑制し、SnRK2は脱抑制(活性化)され、SnRK2の標的因子が活性化され、植物はABA応答をする。PP2CとSnRK2の活性化の状態は、☆で示すものは活性化、×で示したものは不活性化を表す。

PYL/RCARはABAと結合し、PP2Cとヘテロな2量体を形成することでPP2C活性を抑制する。そのため、脱抑制されたSnRK2は、標的因子を活性化し、そのリン酸化を介したシグナルが下流へ伝わり、植物はABA応答をする。ABA非感受性を引き起こす優勢変異である*abi1-1*変異タンパク質は、ABA依存的なPYR1との相互作用が強く抑制されていた⁵⁾。*abi1-1*は、PP2C活性を保持することから、*abi1-1*変異体はABA存在下において、PYR/PYL/RCARによるPP2C活性の阻害を受けないため、常にSnRK2

の活性化を抑制し、優勢のABA非感受性の表現型を示すことが明らかになった。

6. 立体構造解析から見てきたABA受容とシグナル伝達機構の実体

ABA受容体PYR/PYL/RCARの同定から間もなく、PYR/PYL/RCAR単体およびABAとの複合体、さらに、PYR/PYL/RCAR-ABA-PP2C複合体の立体構造がX線構造解析により明らかにされた(図-4)⁷⁻¹¹⁾。PYR/PYL/RCARは、Bet v1様タンパク質と類似した構造をとり、C末端

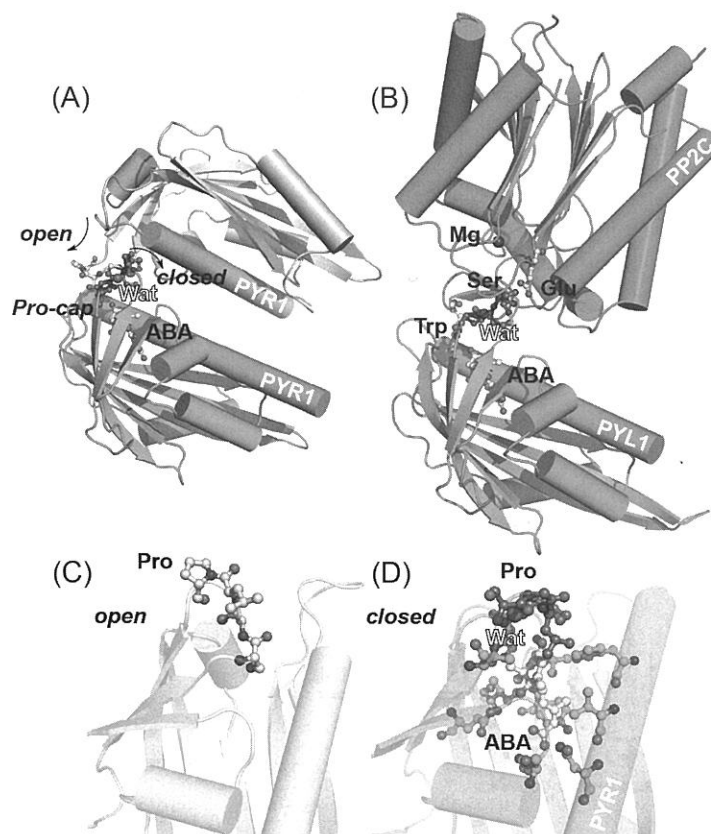


図-4 PYR/PYL/RCAR-ABA と PYR/PYL/RCAR-ABA-PP2C の複合体の X 線結晶構造

(A) ABA が結合した PYR1 (下) と PYR1 単体 (上) の構造。PYR1 はホモ 2 量体を形成し、ABA と水分子 (Wat) を内部の空洞に取り込む。(B) ABA が結合した PYL1 と PP2C の複合体構造。PYL1 は PP2C の活性部位の近傍で結合し、安定なヘテロ 2 量体を形成し、PP2C 活性を抑制する。(C, D) ABA 結合部位の詳細。PYR1 は ABA と水分子 (Wat) を内部の空洞に取り込むと、構造変化を引き起こし、蓋を閉じることで、PP2C と結合する。

に長い α ヘリックスをもつグリップ型様の折りたたみ構造し、その特徴として、内側に低分子を取り込む空洞を持っていた(図-4A)。ABAが空洞に取り込まれると、PYR/PYL/RCARはPro-cap (PYR1のVal183からAsn90に相当)とLeu-lock (PYR1のGlu114からThr118に相当)と呼ばれる2つのループ領域の構造が変化する(図4C-D)。これらの領域はちょうど蓋の役割をし、内部の空洞を閉じることで、PYR/PYL/RCARはABAと安定な複合体を形成する。ABAと結合するアミノ酸残基の多くはPYR/PYL/RCAR間でよく保存されているが、例外として、PYL13はABAを直接認識するPYR1のLys59に相当するアミノ酸残基がGlnであった。PYR1のLys59をGlnに置換したタンパク質は、ABI1とのABA依存的な相互作用が強く抑制されたことから、PYL13は他のPYR/PYL/RCARと機能的に異なることが示唆された。ピラバクチン耐性に関わるPYR1変異の多くは、ABAの認識部位や可変部位の近傍に位置した。このことより、PYR/PYL/RCARは、ピラバクチンのような人工的な化合物を取り込むことが可能であると考えられた。

PYR1のホモログであるPYL1とPP2Cの立体構造解析から、PYR1のSer85に相当するアミノ酸残基は、ABI1のPP2C活性部位のGlu142に相当するアミノ酸残基と結合し、PP2C活性を直接制御することが示唆された(図-4B)⁹⁻¹¹⁾。ABI1のTrp300に相当するアミノ酸残基は、外側の狭い疎水性の隙間に入り込み、水を介してPYR1のPro88やArg116に相当するアミノ酸残基と水素結合し、安定した複合体を形成することが明らかになった。abi1-1は、Gly180Aspのアミノ酸置換によって引き起こされる。その理由として、PYR1のSer85に相当するアミノ酸

残基がABI1のGly180と近接しており、Aspに置換されることで水素結合が乱される、または、PYR/PYL/RCAR-PP2Cの間の立体障害が生じるためと考えられた。また、ABA非依的にPP2Cと相互作用するPYL10とPP2Cの立体構造も解明された¹⁶⁾。PYL10はABA非依存下でもPro-capとLeu-lockが閉じた状態でPP2Cと結合し、常にPP2C活性を抑制していた。このことから、PYL10はABA受容体以外の機能も持つ可能性があり、今後の研究は興味深い。

ピラバクチンとPYR1, PYL1, PYL2との複合体構造も報告され、ピラバクチンはPYR1の内部空間に取り込まれると、ナフタレン環とピリミジン環が向かい合うV字構造を形成し、ABAと同様、PYR1のLys59, Glu94やGlu141に相当するアミノ酸残基と水を介した水素結合を形成していた¹⁷⁻²⁰⁾。一方、PYL2はピラバクチンを取り込むことはできるが、PYR1で見られるようなピラバクチン依存的なPP2Cとの相互作用は起こさなかった。このことから、ピラバクチンはPYL2に対し、ABAアゴニストではなく、ABAアンタゴニストとして作用することが示唆された。さらに、ピラバクチンの構造を基に、PYL1に結合する可能性がある新たな化合物も報告された¹⁷⁾。

ごく最近、PP2CとSnRK2の複合体構造が報告され、SnRK2とPP2Cの結合部位はPYR/PYL/RCARとPP2Cの結合と非常に似た構造をしていることが明らかになった²¹⁻²³⁾。SnRK2のリン酸化に重要な活性化ループは、PP2C活性部位に入り込み、また、PYR/PYL/RCARとの結合に重要なアミノ酸残基であるABI1のTrp300に相当するアミノ酸残基が、SnRK2のリン酸化触媒部位の隙間に入り込むため、SnRK2はPP2Cによって活性抑制を受けていた。

7. おわりに

ABA受容体が遺伝学的に同定されなかった理由は、機能重複していたためという結論で長年の疑問は解決された。シロイヌナズナでの解析により、種子休眠や気孔の閉口応答、ストレス耐性などに関わるABAの受容とシグナル伝達機構の全容が解明されつつある。イネにおいても、PYR/PYL/RCAR, PP2C, SnRK2, ABF/AREBに相当する因子間の相互作用が確認され、OsPYL/RCAR5を過剰に発現させた組換えイネは、シロイヌナズナのPYL5やPYL9過剰発現体同様、種子発芽や初期生育において、ABA高感受性を示し、ABA誘導性遺伝子の発現量も高まることが明らかになっている²⁴⁾。このことから、ABA受容とシグナル伝達機構はシロイヌナズナだけでなく、他の作物でも保存されている可能性が高く、シロイヌナズナで得られた知見を様々な作物へ利用することができると考えられる。一方、果実の登熟など作物の品質を左右する形質の中には、シロイヌナズナでは見られないが、ABAが深く関与している形質がある。今後は、他の植物種での更なるABAシグナル伝達の研究も必要な課題と思われる²⁵⁾。

PYR/PYL/RCARの立体構造解析から得られた知見を利用し、ABAをより認識しやすいPYR/PYL/RCARの設計やABAと同じような作用を示す可能性がある人工化合物も報告されている^{17,26)}。近い将来、環境ストレスに耐性を示す有用作物の開発や植物に環境ストレス耐性を付与する薬剤の創製、利用につながる事が期待される。

謝辞

本稿の作成にあたり、PYR1の立体構造の図

を作成し、本稿を査読して頂いた米国スク립ス研究所の人見研一博士に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Hubbard, K. E. et al. (2010) *Genes Dev* 24, 1695-1708
- 2) Cutler, S. R. et al. (2010) *Annu Rev Plant Biol* 61, 651-679
- 3) Ma, Y. et al. (2009) *Science* 324, 1064-1068
- 4) Nishimura, N. et al. (2010) *Plant J* 61, 290-299
- 5) Park, S. Y. et al. (2009) *Science* 324, 1068-1071
- 6) Santiago, J. et al. (2009) *Plant J* 60, 575-588
- 7) Nishimura, N. et al. (2009) *Science* 326, 1373-1379
- 8) Santiago, J. et al. (2009) *Nature* 462, 665-668
- 9) Melcher, K. et al. (2009) *Nature* 462, 602-608
- 10) Miyazono, K. et al. (2009) *Nature* 462, 609-614
- 11) Yin, P. et al. (2009) *Nat Struct Mol Biol* 16, 1230-1236
- 12) Bhaskara, G. B. et al. (2012) *Plant Physiol* 160, 379-395
- 13) Yu, F. et al. (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14693-14698
- 14) Umezawa, T. et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17588-17593
- 15) Dupeux, F. et al. (2011) *Embo J* 30, 4171-4184
- 16) Hao, Q. et al. (2011) *Mol Cell* 42, 662-672
- 17) Melcher, K. et al. (2010) *Nat Struct Mol Biol* 17, 1102-1108
- 18) Peterson, F. C. et al. (2010) *Nat Struct Mol Biol* 17, 1109-1113
- 19) Yuan, X. et al. (2010) *J Biol Chem* 285, 28953-28958
- 20) Hao, Q. et al. (2010) *J Biol Chem* 285, 28946-28952

21) Soon, F. F. et al. (2011) *Science* 335, 85-88
 22) Xie, T. et al. (2012) *J Biol Chem* 287, 794-802
 23) Yunta, C. et al. (2011) *J Mol Biol* 414, 135-144
 24) Kim, H. et al. (2012) *J Exp Bot* 63, 1013-1024

25) Ben-Ari, G. (2012) *Plant Cell Rep* 31, 1357-1369
 26) Mosquna, A. et. al (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20838-20843

時代のニーズにお応えします! 協友アグリの水稲用除草剤!

難防除雑草から田植同時までバッチリ対応! **低コスト・高効果・省力防除!**



バッチリ
1キロ粒剤/フロアブル/ジャンボ

2成分で強力除草!



サラブレッド[®]
RX フロアブル

3成分3製剤でキチット効きます!



ピットリ-2
1キロ粒剤/フロアブル/ジャンボ



キチット
1キロ粒剤
ジャンボ
フロアブル



ノビエ



ホタルイ



コナギ



アゼナ



オモダカ



クログワイ

●使用前にはラベルをよく読んでください。●ラベルの記載以外には使用しないでください。●本剤は小児の手の届く所には置かないでください。●空容器・空袋は圃場などに放置せず、適切に処理してください。



JAグループ
農 協 | 全農 | 経済連
登録商標 第4702318号



協友アグリ株式会社
神奈川県川崎市高津区二子6-14-10