

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770104

研究課題名（和文） アブシシン酸トランスポーターのX線結晶構造解析

研究課題名（英文） X-ray crystallography of abscisic acid transporter

研究代表者

宮川 拓也（MIYAKAWA TAKUYA）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：50596559

研究成果の概要（和文）：本研究では、アブシシン酸（ABA）の細胞間輸送の鍵となる2種類のABAトランスポーターを対象とし、X線結晶構造解析のための試料調製法の検討を行った。*Pichia pastoris*を用いた酵母発現系を構築し、ABAトランスポーターが膜画分へ発現することが示された。また、種々の界面活性剤による可溶化を検討し、Fos-choline 12またはLDAOで効果的にABAトランスポーターを可溶化できることが示された。これらの成果は、ABAトランスポーターの立体構造に基づいてABA輸送機構を理解するための基盤となるものである。

研究成果の概要（英文）：This research has established a method for preparing two types of abscisic acid (ABA) transporters that are key membrane proteins for an intercellular ABA transport. The ABA transporters were overexpressed as membrane fractions by using the yeast expression system of *Pichia pastoris*. Moreover, detergent screening experiments also showed that ABA transporters were efficiently solubilized with Fos-choline 12 or LDAO among several tested detergents. These results are available with sample preparation for the structural analysis of the ABA transporters, which helps us understand the molecular mechanism of intercellular ABA transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 移動の自由のない植物は、温度変化や乾燥といった環境ストレスを絶えず受けている。その中でも乾燥や塩などの水分ストレスは陸上植物にとって生存に関わる重要な因子の1つであり、植物の成長に大きな影響を与えている。世界の多くの地域における緑地の砂漠化、世界各地での異常気象は近年大きな問題となっており、早ばつや塩害は農業生産に大きな被害を及ぼしている。このような

環境問題と食糧の安定かつ持続的な確保の観点から、突然の異常気象や劣悪環境下でも栽培可能な作物の開発が、国際的に重要な課題となっており、そのための研究が国内外において盛んに取り組まれている。

(2) 植物は、長い進化の過程で、環境の変化をいち早く感じ取って適応するための応答機構を獲得してきたものと考えられ、乾燥などに対するストレス耐性を誘導する主要な

機構として、植物ホルモンの1つであるアブシシン酸 (abscisic acid, ABA) の作用が知られている。植物が乾燥などのストレス刺激を受けると、ABA が水分の輸送ラインである維管束組織の細胞内で合成される。この ABA は気孔の孔辺細胞などに移動し、細胞内 ABA 受容体の PYR/PYL/RCAR を介して、脱リン酸化酵素 PP2C の活性を阻害する。PP2C の制御が外れた SnRK2 は、そのリン酸化活性により様々な下流因子の活性を調節し、気孔の閉鎖による蒸散量の低下やストレス耐性に働く様々な遺伝子発現を誘導する。このような ABA によるストレス応答経路の調節は、乾燥ストレス耐性作物の開発の観点で重要であり、細胞内における ABA 受容機構とストレス応答の詳細な調節機構は申請者らにより明らかになっている。

(3) ABA 合成の場である維管束細胞から離れた孔辺細胞において、速やかな ABA 応答が行われるためには、細胞間の ABA 輸送システムが必要と考えられる。その役割を担う ABA トランスポーターとして AtABCG25 及び AtABCG40 の2種類がシロイヌナズナにおいて同定されている。AtABCG25 を過剰発現させた植物では気孔の閉鎖が促進され、AtABCG40 の機能欠損株では気孔の閉鎖が遅れ、乾燥耐性も低下するという表現型が示されている。したがって、ABA トランスポーターによる ABA 輸送の詳細な分子機構の解明は、植物における細胞間の ABA 選択的な輸送機構の理解だけでなく、植物の乾燥ストレス応答制御の観点から細胞内 ABA 濃度の制御の理解にとっても極めて重要である。

2. 研究の目的

(1) 本研究で対象とする ABA トランスポーターは AtABCG25 及び AtABCG40 の2種類である。AtABCG25 は、**White-brown complex homolog (WBC)** サブファミリーに属する ATP-binding Cassette (ABC) トランスポーターであり、主に維管束組織に発現して ABA を細胞内から細胞外に輸送するエキスポーターとして働く。一方、AtABCG40 は **Pleinotropic drug resistance (PDR)** サブファミリーに属する ABC トランスポーターであり、孔辺細胞に強く発現して ABA を細胞内に取り込むインポーターとして働く。これらの ABA トランスポーターは、いずれも ABA を選択して ATP 依存的に輸送することができる。

(2) 本研究は、X 線結晶構造解析の手法を用いて、原子レベルの分解能で AtABCG25 及び AtABCG40 の立体構造を決定し、ABA トランスポーターによる細胞内外の ABA 輸送機構を解明することを最終目的としている。

AtABCG25 及び AtABCG40 の立体構造の決定は、植物の乾燥ストレス応答の鍵となる ABA 輸送の分子機構の理解だけでなく、真核生物由来の ABC トランスポーターについて、その新たな輸送機構を理解する上でも極めて重要である。

3. 研究の方法

(1) 酵母発現ベクターの構築

ABA トランスポーターは膜タンパク質であるため、発現量が少なく検出が困難である可能性が予想された。そこで、標的となる膜タンパク質のみを効果的に検出するために、蛍光タンパク質との融合体として発現可能な酵母発現ベクターを構築した。この発現ベクターに *Arabidopsis thaliana* 由来 total RNA から逆転写・PCR 増幅した AtABCG25 及び AtABCG40 の塩基配列を組み込んだ。

(2) 発現確認と高効率発現株の選択

AtABCG25 及び AtABCG40 の酵母発現ベクターを用いてメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* の複数株を形質転換した。プレート培地に形成されたコロニーの中から薬剤耐性を指標にして高コピー株を選抜した。液体培地を用いて各コロニーを培養し、メタノール添加による発現の誘導開始から 120 時間まで定期的にサンプリングした。各酵母形質転換体の膜画分を超速心分離により調製し、AtABCG25 及び AtABCG40 の発現とその蓄積量を評価した。

(3) 界面活性剤による可溶化の検討

(2) で選抜した酵母形質転換体を大量培養し、膜画分を回収した。この膜画分に対して種々の界面活性剤を終濃度 1% で添加し、超速心分離後の可溶性画分における AtABCG25 及び AtABCG40 の量を評価した。

(4) 精製条件の検討

界面活性剤を用いて可溶した AtABCG25 及び AtABCG40 について、His タグを利用したアフィニティー精製と樹脂内タグ切断を行い、その精製度を評価した。

4. 研究成果

(1) 酵母発現ベクターの構築

蛍光タンパク質には GFP とほぼ同じ励起・蛍光波長をもち、且つ輝度の高い Azami-Green を選択した。野生型の Azami-Green は四量体であるため、融合した膜タンパク質の会合性に影響を与える可能性が考えられた。そこで、アミノ酸残基の置換により単量体に改変した Azami-Green (monomeric Azami-Green, mAG) を最終的に用いた。ベースとな

る発現ベクターには *P. pastoris* 用の酵母発現ベクター pPICZ B 及び pPICZ α B を選択した。*P. pastoris* はメタノール資化性の酵母であり、膜タンパク質の調製において複数の成功例が報告されている。pPICZ B ベクター及び pPICZ α B ベクターに mAG の塩基配列、精製の His タグをコードする塩基配列、タグ除去用の TEV プロテアーゼ切断サイトをコードする塩基配列を組み込み、N 末端及び C 末端に mAG 等の付加配列を融合可能な酵母発現ベクター (pPICZ B 改変ベクター及び pPICZ α B 改変ベクター) を構築した。

HMMTOP サーバー等によるトポロジー解析の結果から、AtABCG25 及び AtABCG40 はいずれも N 末端が細胞外、C 末端側が細胞内と推定された。しかし、このトポロジーでは AtABCG25 及び AtABCG40 の ATPase ドメインが細胞外に位置することが示唆され、実際のトポロジーは予測と異なる可能性も考えられた。そこで、AtABCG25 及び AtABCG40 の全長に対応する塩基配列を pPICZ B 改変ベクター (N 末端: 細胞内・タグ融合、C 末端: 細胞外) 及び pPICZ α B (N 末端: 細胞外、C 末端: 細胞内・タグ融合) に組み込んだ。これにより、AtABCG25 及び AtABCG40 について 2 種類の *P. pastoris* 用発現ベクターを構築した。

(2) 発現確認と高効率発現株の選択

(1) で構築した AtABCG25 及び AtABCG40 用の各 2 種類の発現ベクターを用いて、3 種類の *P. pastoris* 株 X-33、GS115、及び KM71H を形質転換し、各 100 個のコロニーを得た。これらコロニーを Zeocin の濃度が異なるプレート培地に継代し、コロニーの大きさから薬剤耐性及びその由来となる標的遺伝子のコピー数を評価し、各 20 個のコロニーを選抜した。

液体培養後の各菌体の膜画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離し、各膜タンパク質の蓄積量を mAG の蛍光を指標にして観察した。その結果、pPICZ α B 改変ベクターで形質転換した複数のコロニーにおいて、AtABCG25 及び AtABCG40 の膜画分への蓄積が 72 時間まで観察され、それ以上の時間では分解断片と推定される低分子量のバンドが観察された。3 種類の *P. pastoris* 株の中で、特に GS115 の形質転換体では効果的な蓄積が観測された。pPICZ α B 改変ベクターでは、N 末端が細胞外、C 末端が細胞内のトポロジーをもつ膜タンパク質の発現が強制されるため、AtABCG25 及び AtABCG40 は HMMTOP サーバーで予測されたトポロジーをもつことが示唆された。最終的に、GS115 形質転換体の各 1 種類を選抜した。

(3) 界面活性剤による可溶化の検討

膜タンパク質の可溶化で一般的に使用される 6 種類の界面活性剤 (n-decyl β -D-maltopyranoside, DM; n-dodecyl β -D-maltoside, DDM; octyl β -D-glucopyranoside, OG; lauryldimethylamine-N-oxide, LDAO; Fos-choline 12; C12E9) を用いた。これら界面活性剤による AtABCG25 及び AtABCG40 の可溶化度を評価した結果、いずれの界面活性剤においても可溶化が認められた。可溶化の量は Fos-choline 12 及び LDAO で最も多く、これら界面活性剤は可溶化効率が高いことが示された。

(4) 精製条件の検討

Fos-choline 12 または LDAO で可溶した AtABCG25 及び AtABCG40 を IMAP 樹脂 (Co キレート) に供し、さらに TEV プロテアーゼを用いて樹脂内で融合タグ配列を切断し、溶出画分を SDS-PAGE で確認した。その結果、精製度は十分ではなかったが、樹脂内での各膜タンパク質の濃縮と精製を確認することができた。

(5) 成果のまとめと展望

本研究において新たに構築した pPICZ B 改変ベクター及び pPICZ α B 改変ベクターを用いることにより、AtABCG25 及び AtABCG40 を膜画分に発現させることができた。この発現ベクターは、*P. pastoris* を宿主として膜タンパク質を発現・評価するための 1 つのツールとして有用である。

AtABCG25 及び AtABCG40 を膜画分から可溶化する際に Fos-choline 12 及び LDAO が有効であることが示された。精製条件に関しては今後さらなる検討が必要であるが、本研究で構築した AtABCG25 及び AtABCG40 の酵母発現株は、ABA トランスポーターの立体構造に基づいて ABA 輸送機構を理解するための基盤となる成果である。今後はこの成果に基づき、mAG の蛍光検出とゲル濾過分析を組み合わせて単分散性を評価することで、結晶化・構造解析に適した状態での試料調製法の確立が望まれる。

ABA トランスポーターによる ABA 輸送機構の理解が深まることで、ABA 流量を適切に制御した変異体の設計や制御を可能にする化合物設計への道が開け、ABA 輸送の制御による新たな乾燥ストレス耐性植物の創出につながることが期待される。また、ABA インポーターである AtABCG40 の基質選択性の拡大などにより、細胞内 ABA 受容体の機能を標的としたアゴニスト分子を効果的に細胞内へ輸送することにも応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- (1) Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M. (2013) Structure and function of abscisic acid receptors. Trends Plant Sci 18(5), 259-266. 査読有
DOI: 10.1016/j.tplants.2012.11.002
- (2) Miyakawa T, Tanokura M. (2011) Regulatory mechanism of abscisic acid signaling. Biophysics 7, 123-128. 査読有
DOI: 10.2142/biophysics.7.123

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 拓也 (MIYAKAWA TAKUYA)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教
研究者番号：50596559