

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688044

研究課題名(和文) アブシジン酸の認識を制御するタンパク質複合体の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ABA receptor-signaling complex

研究代表者

西村 宜之(Nishimura, Noriyuki)

独立行政法人農業生物資源研究所・放射線育種場・研究員

研究者番号：70405041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円、(間接経費) 6,150,000円

研究成果の概要(和文)： ABA受容体であるPYR/PYL/RCARの相互作用因子と翻訳後修飾部位の同定、並びに、ABA受容体に結合する天然リガンドを探索した。ABA受容体はクラスターAに属するPP2Cと非常に強く相互作用し、ユビキチン化により植物体内のABA受容体の量が調整され、ABAシグナルを制御する可能性が示唆された。また、ABA受容体はABAと似た作用を示すが、ABAとは異なる化合物と結合する可能性を示唆する結果を得た。ABAシグナルで働くPP2C間で相互作用因子が一部異なることから、植物は相互作用因子をつまたく使い分けABAシグナルを伝達すると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We pursued to identify the ABA receptors PYR/PYL/RCAR interacting proteins, post-translational modification sites in PYR/PYL/RCAR and natural ligands bind to PYR/PYL/RCAR. PYR/PYL/RCAR strongly interacts with cluster A PP2Cs and seems to be regulated by ubiquitination. The candidate natural ligands bind to PYR/PYL/RCAR has ABA like function but not ABA. The cluster A PP2Cs interact with different known ABA signaling components among them, suggested that plant conveniently selected the interactors to transduce ABA signaling.

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 境界農学・応用分子細胞生物学

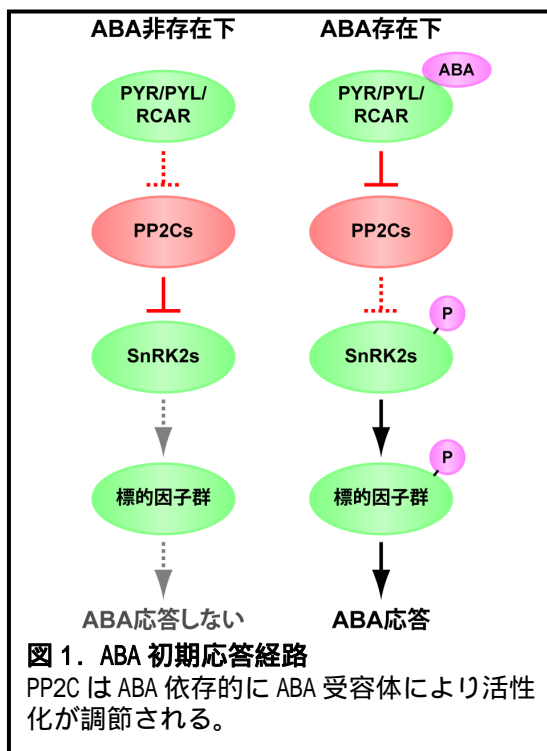
キーワード： アブシジン酸 シグナル伝達 タンパク質脱リン酸化酵素 環境応答

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンの1つであるアブシジン酸 (ABA) は、植物の環境ストレス応答における重要な調節物質であり、種子休眠や種子発芽の抑制、気孔の閉鎖など多岐に植物の生理作用に關与する。

これまでに、研究代表者らは ABA シグナル伝達経路を制御する mRNA 分解酵素や新規タンパク質脱リン酸化酵素 2C (PP2C) の同定に成功し、さらに、ABA シグナル伝達経路の最上流で働く新規 ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR ファミリーを独自に同定した。これらの研究を通じ、ABA シグナル認識および初期応答は、PYR/PYL/RCAR、PP2C と ABA により活性化するタンパク質リン酸化酵素 SnRK2 の 3 つを中心に構成され、PYR/PYL/RCAR は PP2C と相互作用し、ABA 依存的に PP2C 活性を調節するメカニズムを明らかにした (図 1)。

しかし、未だ細胞や組織レベルでの ABA 認識やシグナル制御機構の理解には至っていない。そこで、研究代表者は新たな ABA 認識やシグナル伝達を制御する因子の同定や既知の ABA シグナル因子間の関係などをさらに明らかにする必要があると考えた。



2. 研究の目的

研究代表者らが PYR/PYL/RCAR を発見して以降、ABA シグナル伝達は急速に解明されつつある。しかし、ABA の認識機構の全容解明には至っていない。

本研究では、ABA 受容体である PYR/PYL/RCAR の相互作用因子や翻訳後修飾部位の同定、並びに、PYR/PYL/RCAR に結合する天然リガンドを探索した。さらに、ABA 受容体と既知の ABA シグナル因子との関係を明らかにし、ABA 認識を制御するタンパク質複

合体の実態とその制御機構の解明に迫ることを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) PYR/PYL/RCAR ファミリーに相互作用する因子の同定

シロイヌナズナには 14 個の PYR/PYL/RCAR が存在する。これらのうち、PYR1、PYL1 と PYL9 に YFP を融合したタンパク質を過剰に発現させたシロイヌナズナ遺伝子組換え植物体を作成した。YFP-PYR1、YFP-PYL1 と YFP-PYL9 過剰発現体より、YFP-PYR1、YFP-PYL1 と YFP-PYL9 に相互作用する因子を抗 GFP 抗体ビーズ、または、抗 GFP 抗体カラムで精製し、質量分析計により、候補相互作用因子の単離・同定を行った。候補相互作用因子は、酵母 2 ハイブリット法により真の相互作用因子であるか検証した。さらに、候補因子については、過剰発現体を作成し、ABA による種子発芽の抑制効果を評価した。

(2) PYR/PYL/RCAR ファミリーの翻訳後修飾部位の探索

(1) と同様に、YFP-PYR1、YFP-PYL1 と YFP-PYL9 過剰発現体より、YFP-PYR1、YFP-PYL1 と YFP-PYL9 融合タンパク質を抗 GFP 抗体ビーズ、または、抗 GFP 抗体カラムで精製し、質量分析計により YFP-PYR1、YFP-PYL1 と YFP-PYL9 の候補翻訳後修飾部位の同定を試みた。候補翻訳後修飾部位に変異を導入した変異タンパク質を一過的、または、過剰に発現させた植物体を作成し、変異タンパク質と PP2C との相互作用と ABA による種子発芽の抑制効果を評価した。

(3) PYR/PYL/RCAR ファミリーに結合する天然リガンドの探索

(1) と同様に、YFP-PYL9 過剰発現体より、YFP-PYL9 融合タンパク質を抗 GFP 抗体カラムで精製し、YFP-PYL9 に結合する天然リガンドを溶出した。ABA 様の活性を指標に、溶媒分配や HPLC により更なる精製を行い、NMR と質量分析計により、YFP-PYL9 に結合する天然リガンドの探索を行った。

(4) PYR/PYL/RCAR に制御されないタンパク質脱リン酸化酵素の解析

先行研究より、PYR1 は PP2C の一つである AHG1 と相互作用しない可能性が示唆されていた。そこで、AHG1 と PYR/PYL/RCAR ファミリーの相互作用を共沈免疫遠心法で評価した。また、AHG1 を介した ABA シグナルで働く因子と図 1 に示す主要な ABA シグナル経路で働く因子との関係を酵母 2 ハイブリット法で検証した。

4. 研究成果

(1) PYR/PYL/RCAR ファミリーに相互作用する因子の同定

YFP-PYR1 と YFP-PYL1 候補相互作用因子は

抗 GFP 抗体ビーズ、YFP-PYL9 候補相互作用因子は抗 GFP 抗体カラムで精製し、質量分析計により候補相互作用因子の単離・同定を試みた。前者の抗 GFP 抗体ビーズを用いた系では、精製条件が厳しかったため、さほど候補相互作用因子を得ることが出来なかった。一方、抗 GFP 抗体カラムを用いた系では、精製条件がマイルドであったため、多くの候補相互作用因子を同定することに成功した。まず、既知の ABA シグナルで働く因子が存在するかを調べたところ、抗 GFP 抗体ビーズと抗 GFP 抗体カラムを用いた両方の系で既に ABA 受容体と相互作用すると報告がある ABI1 や AHG3 を含む多くのクラスター A に属する PP2C が存在した。これら PP2C のスペクトルカウントは、ABA 処理により比率が高まっていた。

PP2C 以外の候補相互作用因子について、酵母 2 ハイブリット法で ABA 受容体との相互作用を評価したところ、PYL9 と相互作用する因子を 1 個見だし、PYP1 (PYL9 interacting protein) と名付けた。PYP1 は機能重複が考えられたため、PYP1 を過剰に発現させた植物体を作成し、ABA による種子発芽の抑制を調べたが、ベクターコントロールと比べ有意な差は見られなかった。

## (2) PYR/PYL/RCAR ファミリーの翻訳後修飾部位の探索

質量分析計を用いた解析より、リン酸化とユビキチン化する可能性がある PYL9 の候補アミノ酸残基を同定することに成功した。リン酸化する可能性があるアミノ酸残基は、アラニンとアスパラギン酸に置換させた変異タンパク質を過剰に発現させた植物体を作成し、ABA による種子発芽の抑制効果を指標に、野生型 PYL9 を過剰に発現させた植物体と比較解析した。その結果、アミノ酸置換を導入した変異 PYL9 過剰発現体は、野生型 PYL9 過剰発現体と比べ、ABA に対する感受性が弱まっていた。一方、ユビキチン化する可能性があるアミノ酸残基をアルギニンに置換し、変異タンパク質を過剰に発現させた植物体は、野生型 PYL9 過剰発現体に比べ、ABA に対する感受性が若干高まっていた。この PYL9 変異タンパク質は、ABI1 と相互作用した。現在、今回同定したアミノ酸残基がユビキチン化することにより、植物体内の PYL9 の量が調整され、ABA シグナルを制御しているかを検証している。

## (3) PYR/PYL/RCAR ファミリーに結合する天然リガンドの探索

GC-MS、TOF-MS と NMR などを用い、PYL9 に結合する天然リガンドの同定を試みた。その結果、ABA と類似した作用を示すが、ABA とは異なる化合物が PYL9 と結合する可能性を示唆する結果を得た。現在、天然リガンドを同定するため、更なる解析を進めており、今後の結果が期待される。

## (4) PYR/PYL/RCAR に制御されないタンパク質脱リン酸化酵素の解析

AHG1 といくつかの PYR/PYL/RCAR との相互作用を共沈免疫遠心法で調べたが、ABI1 が示すような PYR/PYL/RCAR との相互作用は見られなかった。一方 AHG1 と似た機能を示すと考えられている AHG3 はいくつかの PYR/PYL/RCAR と相互作用し、先行研究で見出していた AHG1 相互作用因子である AHIP1 (AHG1 interacting proteins) とも相互作用した。AHIP1 は主要な ABA シグナル経路で働く既知の ABA シグナル因子と相互作用することから、ABA の認識を制御するタンパク質複合体である ABA 受容体と PP2C は、相互作用因子をうまく使い分け、ABA シグナルを伝達すると考えられ、現在検証実験を行っている。

## 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 5 件)

Waadts R, Hitomi K, Nishimura N, Hitomi C, Adams S.R, Getzoff E.D, Schroeder J.I (2014) FRET-based reporters for the direct visualization of abscisic acid concentration changes and distribution in Arabidopsis *eLife* 3:e01739 (査読あり)

doi: 10.7554/eLife.01739.

Wang Y-F, Munemasa S, Nishimura N, Ren H-M, Robert N, Han M, Puznrjova I, Kollist H, Lee S, Mori I, Schroeder J.I (2013) Identification of cyclic GMP-activated nonselective Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channels and associated *CNGC5* and *CNGC6* genes in Arabidopsis guard cells *Plant Physiology* 163(2):578-590 (査読あり)

doi: 10.1104/pp.113.225045.

Laanemets K, Wang Y-F, Lindgren O, Wu J, Nishimura N, Lee S, Caddell D, Merilo E, Brosche M, Kilk K, Soomets U, Kangasjärvi J, Schroeder J.I, Kollist H (2013) Mutations in the SLAC1 anion channel slow stomatal opening and severely reduce K<sup>+</sup> uptake channel activity via enhanced cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] and increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of K<sup>+</sup> uptake channels *New Phytologist* 197(1):88-98. (査読あり)

doi: 10.1111/nph.12008.

Murayama M, Hayashi S, Nishimura N, Ishide M, Kobayashi K, Yagi Y, Asami T, Nakamura T, Shinozaki K, Hirayama T (2012) Isolation of *Arabidopsis ahg11*, a weak ABA hypersensitive mutant defective in *nad4* RNA editing *Journal of Experimental Botany*

63(14):5301-5310. (査読あり)  
doi: 10.1093/jxb/ers188.  
Kim T-H, Hauser F, Ha T, Xue S, Böhmer M, Nishimura N, Munemasa S, Hubbard K, Peine N, Lee B-h, Lee S, Robert N, Parker J.E, Schroeder J.I (2011) Chemical genetics reveals negative regulation of abscisic acid signaling by a plant immune response pathway *Current Biology* 21(11):990-997 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.cub.2011.04.045.

〔学会発表〕(計5件)

佐藤浩二, Moresco J, Tu P, 林優紀, 木下俊則, Schroeder J.I, Yates J.R, 西村宜之: アブシジン酸シグナルで働く AHG1 の相互作用因子の探索 **第54回日本植物生理学会年会** 2013年3月21日 岡山

西村宜之: アブシジン酸受容および情報伝達機構に関する研究 **第53回日本植物生理学会年会** 2012年3月17日 京都

Nishimura N, Hitomi K, Arvai A.S, Rambo R.P, Wang A, Lee S, Caddell D.F, Sarkeshik A, Nito K, Park S-Y, Hitomi C, Carvalho P.C, Chory J, Yates J.R, III, Cutler S.R, Getzoff E.D, Schroeder J.I: Proteomic analysis of ABA perception and early ABA signaling mechanisms **3rd International Symposium Frontiers in Agriculture Proteome Research: Contribution of proteomics technology in agricultural sciences** 2011年11月8日 つくば

西村宜之 アブシジン酸シグナリングネットワークを介した植物のストレス耐性機構 **藪田セミナー「化学物質による植物のストレス耐性の制御** 2011年7月14日 東京

西村宜之 アブシジン酸受容体 PYR/PYL/RCAR ファミリーを介したアブシジン酸情報伝達機構 **第4回 農芸化学の未来開拓セミナー** 2011年5月20日 岡山

〔図書〕(計1件)

佐藤浩二, 西村宜之 (2013) アブシジン酸受容とシグナル伝達機構の最前線 **植調** 47(2):14-21

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nias.affrc.go.jp/org/GR/IRB/>

2012年度日本植物生理学会奨励賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 宜之 (NISHIMURA Noriyuki)

独立行政法人 農業生物資源研究所・放射

線育種場・主任研究員

研究者番号: 70405041