

平成 27 年 8 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850066

研究課題名(和文) 乾燥耐性植物の育種に向けたアブシジン酸シグナル伝達因子の立体構造に基づく分子改変

研究課題名(英文) Molecular alterations of the abscisic acid signaling factors based on their tertiary structures towards breeding of drought tolerance plants.

研究代表者

澤野 頼子 (Sawano, Yoriko)

東京医科歯科大学・教養部・准教授

研究者番号：00571077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物の乾燥ストレス耐性の獲得機構には、植物ホルモンの1つであるアブシジン酸(ABA)が関わるシグナル伝達系が主要な役割を担っている。本研究では、ABAシグナル伝達系の主要な制御タンパク質であるABA受容体タンパク質PYR/PYL、正の制御因子であるタンパク質リン酸化酵素SnRK2、負の制御因子である脱リン酸化酵素PP2Cについて、相互作用解析により複合体を形成する組み合わせを明らかにし、タンパク質単体およびタンパク質複合体の立体構造解析のために結晶化実験を実施した。本研究により得られた知見は、植物体の耐乾燥性の向上に寄与するような分子改変情報として利用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The signaling pathway related to a plant hormone, abscisic acid (ABA), plays a major role on the acquiring mechanism of resistance to drought in plants. This study was clarified the combinations to form a secondary or a ternary complex by analysis of interactions with key regulatory proteins in ABA signaling pathway, namely ABA receptors PYR/PYL, protein kinases SnRK2s known as positive regulators, and protein phosphatases PP2Cs known as negative regulators, and crystallization experiments on the target single protein and the protein complex were conducted for structural analysis. These findings are expected to provide novel information on the molecular alteration towards breeding of drought tolerance plants.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：植物ホルモン アブシジン酸 乾燥ストレス耐性 分子改変 相互作用解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年、地球規模での温暖化や異常気象が進み、干ばつなど農地環境の悪化による作物収量の減少が深刻化している。食糧資源の6割を輸入に頼っている我が国にとっては、国際的な視野に立った農産資源の安定供給への取り組みが極めて重要であり、乾燥などの劣悪環境下でも栽培可能な作物の開発が急務である。乾燥ストレス耐性作物の国際的な開発動向として、米国企業の Monsanto 社が乾燥に強い遺伝子組換えトウモロコシを開発し、近々上市される見込みである。また、中国では国策として乾燥耐性イネの開発を進めている。これらは、世界的な人口増加による食糧不足やバイオエネルギー資源の獲得競争を背景としており、乾燥ストレス耐性作物の開発は、我が国の経済、産業上で極めて重要な課題である。

植物が乾燥ストレス耐性を獲得する主要な機構として植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) が関わるシグナル伝達系が知られている。ABAシグナル伝達系に関しては、2009年に長年の謎であったABA細胞内受容体タンパク質 PYR/PYLがシロイヌナズナから同定された (Park et al., *Science*, 2009; Ma et al., *Science*, 2009) ことを端緒とし、研究代表者らのグループも含めた数グループがABAシグナル受容・伝達因子の立体構造解析を行い (Miyazono, Sawano et al., *Nature*, 2009; Mercher et al., *Nature*, 2009; Nishimura et al., *Science*, 2009など)、そのメカニズムの理解が一気に進んだ。すなわち、植物が乾燥ストレスにさらされるとABAが細胞内に蓄積され、ABA受容体PYR/PYLに結合し、タンパク質脱リン酸化酵素PP2Cの活性を阻害する。これにより下流のタンパク質リン酸化酵素SnRK2、つづいて転写因子AREB/ABFが活性化し、乾燥ストレスの耐性付与に働く遺伝子群の転写を促進し、植物はストレス耐性を獲得する。一方、非ストレス条件下ではPP2Cはその脱リン酸化能により本シグナル伝達系の抑制因子あるいはフィードバック阻害因子として働く。申請者らは、ABA受容体の1つであるPYL1にABAが結合した状態、さらにこれにPP2Cの1つであるABI1が結合し脱リン酸化活性が阻害されている状態の立体構造を解析し、ABA受容体がABAを受容し、シグナル伝達を活性化する仕組みを原子レベルで明らかにした (Miyazono, Sawano et al., *Nature*, 2009)。本研究では以上の成果を踏まえ、ABAシグナル伝達因子の立体構造に基づいた合理的分子改変により、耐乾燥性に優れた植物の開発の基盤を構築することを目指す。

## 2. 研究の目的

(1) ABAシグナル伝達系を制御するための構造基盤の理解

ABAシグナル伝達系の主要な制御タンパク質およびそれらの複合体を構造生物学的手法により解析し、制御の構造基盤を解明することを目標とする。解析対象は、モデル植

物シロイヌナズナのABA受容体PYR/PYL、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である。シロイヌナズナにおいては、14種類のPYR/PYL、9種類のPP2C、3種類のSnRK2が機能しており、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多様性により、ABA応答の強度は時空間的に様々に調節されている。様々な組み合わせの複合体の構造比較により、各制御タンパク質の機能の多様性を説明する構造基盤を取得することができ、機能向上への分子改変情報として利用することができる。本研究では、以下のこれまでに立体構造が決定されていない構成因子および複合体について、立体構造解析を実施するとともに類縁タンパク質間での構造比較を行う。

SnRK2およびPP2Cとの複合体の構造解析と構造比較により、SnRK2の活性化とPP2Cによる活性阻害に関する構造基盤を解明する。

フィードバック阻害で機能するPP2CとPYR/PYLの複合体の構造解析と構造比較により、フィードバック阻害の構造基盤を解明する。

(2) ABAシグナル伝達制御の構造基盤に基づく、乾燥ストレス耐性を高度化する分子改変

植物の乾燥ストレス耐性を高度化するためには、ABA非存在下または通常機能しない低濃度のABA存在下であっても下流のSnRK2やAREB/ABFを適切な強度で活性化させることが必要である。本研究では、このような考えに基づいた分子改変により、ストレス耐性を高度化することが期待される変異型タンパク質の取得を目指す。具体的には、PYR/PYLおよびPP2Cとの複合体の立体構造情報を利用した合理的な分子改変により、ABA感受性を高めたPYR/PYL改変体やABA非依存的にPP2Cを阻害するPYR/PYL改変体を取得する。

(1)で解明した構造基盤を利用した合理的な分子改変により、PP2Cにより阻害を受けない(受け難い)SnRK2改変体や高リン酸化活性をもつSnRK2改変体を取得する。

(3) 改変分子に対応する遺伝子の植物への導入に向けた試験

上記で得られたストレス耐性を高度化することが期待される変異型タンパク質に対応する遺伝子について植物細胞における一過的発現系を構築し、植物細胞内においてABAを介した遺伝子発現を活性化する機能的な変異型タンパク質遺伝子を選定する。これにより、改変体遺伝子の植物体への導入と耐乾燥性試験に向けた基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) ABAシグナル伝達系制御タンパク質群の

#### 相互作用解析

ABA シグナル伝達系の主要な制御タンパク質のうち、シロイヌナズナ由来の ABA 受容体タンパク質 PYR/PYL の 5 種類 (PYR1, PYL1, PYL2, PYL6, PYL9)、活性化 (正の制御) に働くタンパク質リン酸化酵素 SnRK2 の 3 種類 (SRK2D, SRK2E, SRK2I)、負の制御に働くタンパク質脱リン酸化酵素 PP2C の 4 種類 (ABI1, HAB1, HAB2, HAI1) を解析対象とし、大腸菌を宿主とした大量・高純度発現系を確立した。

各精製タンパク質に対して、GST タグを用いたプルダウンアッセイによる相互作用解析を行い、二者複合体あるいは三者複合体を形成する組み合わせを探索した。

#### (2) ABA シグナル伝達系制御タンパク質群の立体構造解析に向けた検討

(1) で調製した ABA 受容体タンパク質 PYR/PYL、タンパク質リン酸化酵素 SnRK2、タンパク質脱リン酸化酵素 PP2C のうち、これまでに立体構造が解明されていないタンパク質単体、および(1)で相互作用することが確認された組み合わせのタンパク質複合体について、X 線結晶構造解析を行うため、結晶化スクリーニング試薬を用いて結晶化条件を探索した。得られた結晶については、実験室系の X 線回折装置で分解能を確認し、さらなる沈殿剤濃度や pH 条件、各種の添加剤、シーディングを検討して結晶の質と大きさの改善を図り、高分解能の X 線回折データを与える結晶の取得を検討した。得られた結晶については、放射光施設のビームラインを利用して高分解能の X 線回折データの取得を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ABA シグナル伝達系制御タンパク質群の相互作用解析

シロイヌナズナ由来の ABA 受容体タンパク質 PYR/PYL (PYR1, PYL1, PYL2, PYL6, PYL9)、タンパク質リン酸化酵素 SnRK2 (SRK2D, SRK2E, SRK2I)、タンパク質脱リン酸化酵素 PP2C (ABI1, HAB1, HAB2, HAI1) 全長あるいは機能ドメインについて、各々、を大腸菌を宿主とした大量・高純度発現系を確立し、大量精製を行った。GST タグ融合 PP2C タンパク質 (bait) に対して、SnRK2 または自己リン酸化処理した SnRK2 リン酸化体 (prey) を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、各 PP2C は SRK2D リン酸化体および SRK2I リン酸化体と相互作用して二者複合体を形成し、特に ABI1 とは最も強く二者複合体を形成することが示された。

さらに、GST 融合 PP2C に対して、SnRK2 リン酸化体および PYR/PYL を prey として用いて ABA 存在下/非存在下でプルダウンアッセイを行ったところ、ABA 存在下で PP2C、SRK2D/I および各 PYR/PYL が三者複合体を形成し、特に ABI1 とは強く三者複合体を形

成することが示された。

また、PP2C と PYR/PYL とのプルダウンアッセイの結果、ABA シグナル伝達系においてフィードバック阻害に働くことが示唆されている PP2C の 1 つである HAI1 は、ABA 存在下で PYL1 と弱く相互作用することが示された。

##### (2) ABA シグナル伝達系制御タンパク質群の立体構造解析に向けた検討

(1) で調製した ABA シグナル伝達系制御タンパク質のうち、これまでに立体構造が解明されていないタンパク質単体、および(1)で相互作用することが確認された組み合わせの二者あるいは三者タンパク質複合体について、結晶化条件を探索し、結晶が得られた条件について、沈殿剤濃度、pH などを変化させて結晶化条件の最適化を検討した。得られた結晶について、X 線回折実験を行ったが、結晶構造解析に十分な高分解能の X 線回折データを与える結晶は得られなかった。さらに、発現コンストラクトについても、結晶性の向上のため、変異導入や disorder と予想された領域を削除する等の改良を行い、結晶化を検討したが、結晶構造解析に十分な高分解能の X 線回折データを与える結晶は得られなかった。

本研究で得られた知見は、植物体の耐乾燥性の向上に寄与するような機能向上への分子改変情報として利用することができると思われる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

澤野 頼子 (SAWANO, Yoriko)  
東京医科歯科大学・教養部・准教授  
研究者番号：00571077