



植物ホルモン応答機構の分子基盤

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター 上口(田中) 美弥子

はじめに

ジベレリン (GA) は *ent*-ジベレランを基本骨格とする植物ホルモンの1つで (図1), 草丈制御や発芽など様々な生理作用に関わる。最初, ジベレリンは, 馬鹿苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) が産生し, 罹患したイネが異常成長して枯死してしまう原因物質として黒沢英一により発見され, 後に植物自身も合成, 植物ホルモンとして利用していることが明らかになった。ジベレリンの単離, 結晶, 構造解析は, 藪田貞治郎を初めとする多くの日本の農芸化学研究者によって行われ, ジベレリンという名も藪田により命名された。私は, 大学院時代, 微生物酵素の研究を行い, ポスドク時代から現在に至るまでは, 名大でイネ変異体を用いたジベレリンの生合成や応答機構の研究を行ってきた。ここでは, 筆者らが名大で行ってきたこれらの植物ホルモンの研究を中心に解説する。

1. イネ変異体を用いたジベレリンの合成, 応答機構

1-1. *SD1* 遺伝子の単離・同定とジベレリン合成経路

20世紀中頭, 肥料を多く与えても徒長して倒れないような半矮性品種による穀物の大量生産が試みられ, 世界の食料生産に大きく寄与した。いわゆる「緑の革命」である。著者らは, 「緑の革命」に用いられたイネの半矮性品種 *sd1* の原因遺伝子が, GA 合成酵素遺伝子の1つ *OsGA20ox2* であることを明らかにし, 様々な *sd1* アリルが世界のイネの「緑の革命」で用いられていたことを証明した (図2)。ほぼ同時期に単離したイネ *d18* 矮性変異体は, GA 生合成の最終酵素遺伝子 *OsGA3ox2* の欠損変異体であった (図2)。 *sd1* 及び *d18* 変異体が濃緑で幅広の葉を持ち矮性を示す一方で, 節間伸長パターンに異常が無いという共通の表現型を示した。そこで, このような変異形質を調べることで, それまでシロイヌナズナでのみで単離・解析されていた GA 関連遺伝子を単子葉で初めて調べることが可能となった。そこで, 名古屋大学の圃場にストックされていた同様な表現型を示す矮性変異体に対し GA 処理を行い, GA に

対する感受及び非感受性に分類した。感受性を示すものは, 生合成変異体である可能性が高いと考えられたため原因遺伝子を単離同定し, *cps*, *ks*, *ko*, *kao* 変異体であることを示し, イネにおける GA 生合成経路のほぼ全容を明らかにした (図2)。なお, 最近 CRISPR/Cas9 システムで作出した *OsGA3ox1* ノックアウト変異体は, 背丈はまったく正常である一方で, 配偶体型の雄性不稔を示したことから, 一部の重複遺伝子においては, 明確な機能分担が行われていると考えられる。

また, 筆者らは, 節間伸長パターンに異常があるイネ矮性変異体の原因遺伝子が, 別な植物ホルモン, ブラシノステロイドの受容体や合成酵素遺伝子であることも明らかにしている。

1-2. イネにおける GA シグナル伝達の解明

極矮性変異体イネの1つは, 先の分類において GA 非感受性を示し, 筆者らはこの変異体を *GA insensitive dwarf1 (gid1)* と名付けた。 *gid1* は, 5 cm ほどの背丈にしかならず, 濃緑色で幅広の葉をつけた。GA を与えても伸長促進や種子 α -アミラーゼ遺伝子誘導が起きず, 一方で普通のイネの100倍以上のGAを植物体内に蓄積していた。 *gid1* 変異体より原因遺伝子を単離したところ, エステラーゼとよく似た一次構造をもつタンパク質をコードしていることが分かった。このタンパク質と放射ラベルしたGAとの結合活性を調べたところ, GAと特異的に結合し, 変異アリルタンパク質は結合性を示さなかった。また, 活性型GAとは結合する一方で, 不活性化型GAとは結合しなかった。GFPとの融合タンパク質が主に核内に存在していたことから, GID1がGAの核内受容体である可能性が示唆された。

gid1 変異体を解析する以前に, 筆者らは, 極矮性とは逆にGAを多量に与えたようなイネの *slender1 (slr1)* 徒長型変異体が, DELLA タンパク質遺伝子の欠損変異体であることを見出していた。DELLA タンパク質は, 核内に存在する植物固有の転写因子様タンパク質でGA応答の抑制因子として機能し, GAが存在すると自身が分解されることでGA応答が起きていた。そこで, GID1とSLR1の関係を明らかにするため, *gid1 slr1* 二重変異体を作り形質を調べたところ, 二重変異体は *slr1* とまったく同じ形質を示し, そのことは2つの因子が1つのシグナル伝達上に存在していることを示していた。生化学的な2つの関係性を示すために, 酵母ツー・ハイブリッドによりGA存在・非存在下におけるGID1とSLR1タンパク質の結合を調べたところ, GA存在下でのみGID1とSLR1が結合することが分かった。また, GFP-SLR1をイネで発現すると, 通常のイネでは, GA処理により分解されて核から消えるのに対し, *gid1* 変異体の中では核に強く局在しつづき, GA処理をしても核から消えなかった。さらに, *gid1* とよく似た変異体 *gid2* の原因遺伝子が, 26Sプロテアソーム依存的分解に関わるSCF複合体のサブユニット, Fボックスタンパク質をコードしており (SCF^{GID2}), *gid2* 変異体においてもGFP-SLR1の消失が起こらなかった。このことから, このFボックスタンパク質が,

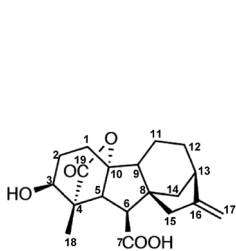


図1. 活性型GAの1つ, GA₄の構造。活性型GAは, C3位に水酸基がつき, C2位に水酸基がつかず, γ -ラク톤環を持ち, C6位にカルボキシル基がついたGAである。

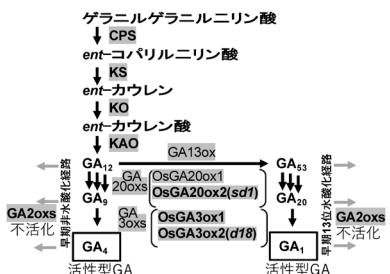


図2. GAの合成経路(→)と不活性化経路(→)。枠で囲んだ, GA₄とGA₁が植物における主な活性型GAである。また, グレイでマーカーしたのは, 合成や代謝の酵素を示す。特に太字のものは, 筆者らが, 単子葉で初めて解析したものである。

SLR1 タンパク質の分解に関与していると推定した。以上のことから、著者らは、GID1 が、GA の核内受容体であると結論し、図3に示すような GID1-GA-SLR1/DELLA 受容システムを提唱した。すなわち、GA が無い時には、SLR1 が GA シグナルを抑制しているが、GA が存在するようになると GA が GID1 受容体に結合し、そのことにより GID1 が SLR1 に結合、SLR1 が SCF^{GID2} を介して分解されるため、GA 応答が起きるというものである。

以上のように、筆者らは、GA の受容体を世界で初めて単離・解析し、GA 応答の根幹である GID1-GA-SLR1/DELLA システムを提唱した。その後、このシステムは、シダから始まるすべての維管束植物に共通していることが、複数のグループにより証明された。

1-3. GID1-GA 複合体の X 線構造解析

ついで、GID1 受容体の GA 認識の構造的な理解のために、イネ GID1 と GA の複合体を結晶化し、構造解析を行った。GID1 は、他のエステラーゼと同様、 α/β 加水分解酵素フォールドから成り、活性中心において多数の疎水・水素結合により GA と結合していた。このフォールドには、catalytic triad と呼ばれる Ser, His, Asp 残基があり、それらの配置も保存されている。GID1 においてもそれらは保存されていたが、His が Val に換わっており、そのため加水分解活性がなかった一方で、これらの3残基は GA 結合に関わっていた。構造解析の結果、GA が GID1 に結合すると、GID1 の N 末側が、活性中心に結合した GA を覆うように蓋をし、その蓋の上側に DELLA タンパク質の DELLA・TVHYNP ドメインが結合できるようになることを、構造情報と酵母ツー・ハイブリッド実験の組み合わせから証明した。以上のように、筆者らは、それまで例のなかった「加水分解酵素フォールドから成り、酵素の活性中心に対応する部位で植物ホルモンを認識するような核内受容体」を発見し、さらにその構造レベルにおける受容機構の解明に至った(図4)。

1-4. GID1 と GA の共進化

進化上の様々な GID1 受容体と GA との結合親和性について、表面プラズモン共鳴法により測定したところ、シダから被子植物になる中で、活性型 GA とはより強く結合し、不活化 GA に対してはより排他的ように進化していることが示された。不活化酵素 (GA の C2 位炭素に水酸基を付加) 配列を植物から選り出しその進化系統樹を作成したところ、活性型 GA に水酸基を付加し不活化する C19-type GA2ox は裸子植物から、GA の生合成中間体に水酸化を付加する C20-type GA2ox は原始被子植物から誕生していることが予想された。さらに、前者の1つである OsGA2ox3 と GA との複合体を結晶化し、X 線結晶構

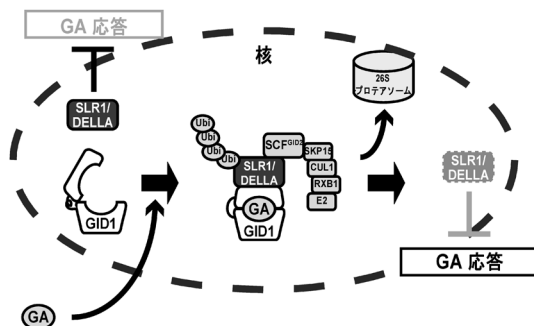


図3. GA シグナル伝達
詳細は、本文を参照されたい。

造解析を行ったところ、構造情報を得ることに成功した。OsGA2ox3 と GA とは、GA の活性型を規定する官能基との間で少数の水素結合により活性中心で結びついており、このような認識の特徴が、短時間での基質特異性の変化を可能にしていると考えられた。以上のことから筆者らは、GID1 受容体の不活化 GA に対する不寛容性と、不活化酵素の基質特異性の変化が、共進化的な GA 受容の微調整を可能にしたと推定した。

さらにまた、OsGA2ox3-GA 複合体が、活性中心で GA と結合するだけでなく、隣り合う酵素モノマー同士を GA を介して結合、4量体化し、不活化活性をアロステリックに調節していることも明らかにした。このような植物ホルモン自身が介在する単量体⇌多量体の活性調節は、オーキシンの不活化酵素にも存在し、植物ホルモンの不活化酵素に広く存在する活性調整であることを示した。おわりに

筆者は、イネの GA 非感受性変異体の原因遺伝子を明らかにすることにより、GA の核内受容体の単離に至った。植物ホルモンの受容体の多くはシロイヌナズナから単離されているが、GA の受容体はイネから始めて単離することができた。イネには GA 受容体が1つしかないために、欠損変異体が GA 非感受性を示してくれた一方で、シロイヌナズナは、3つの遺伝子が冗長的に存在していたという研究の幸運さがあったと思う。もう1点は、GA 受容体がエステラーゼという酵素の基質結合性をリガンド結合性に利用していたことであり、筆者が酵素化学を院生の時に学んでいたからこそ、巡り会えたものであると思う。

(引用文献)

- 1) Ueguchi-Tanaka, M. et al. (2005) *Nature* **437**, 693-698.

謝辞 大学院生の時には、京大発酵醸造学研究室において山田秀明教授と和泉好計教授に微生物発酵と酵素学について1から教えていただいた。山田秀明先生は、昨年の夏、亡くなられた。ここに生前のご恩と多くの教えについて、厚くお礼申し上げます。本研究は、私が、博士過程を終了後、ポスドクとして、名古屋大学の生物機能開発利用研究センターにおける研究に参画してから、現在までの研究をまとめたものです。本研究において、センターの松岡信教授、北野英己教授、芦荻基行教授に大変お世話になりました。また、多くの学生の方々、共同研究の方々にもお世話になりました。この場を借りてお礼申し上げます。

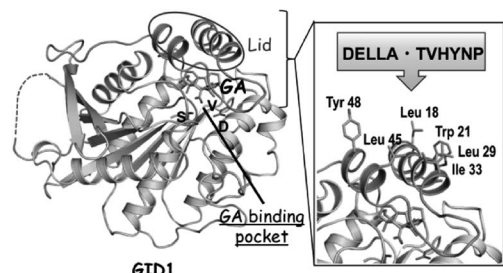


図4. X 線結晶構造解析から決定されたイネの GID1 受容体の構造

左図：GID1 受容体の全体像。詳細は本文を参考にされたい。

右図：Lid 部分を拡大したもの。GA が GID1 に結合すると、GID1 の N 末側の Lid の上部分にいくつもの疎水的なアミノ酸が突き出るようになり、SLR1 (DELLA タンパク質) の DELLA・TVHYNP ドメインが結合できるようになる。