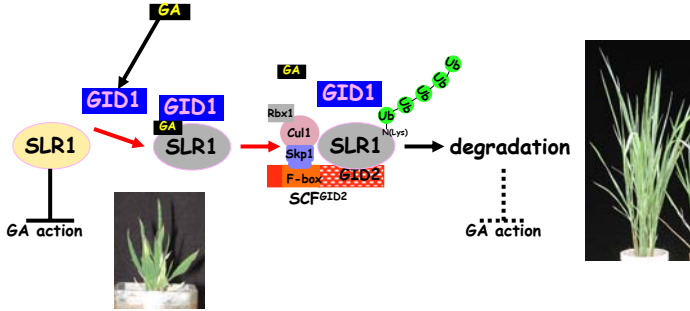
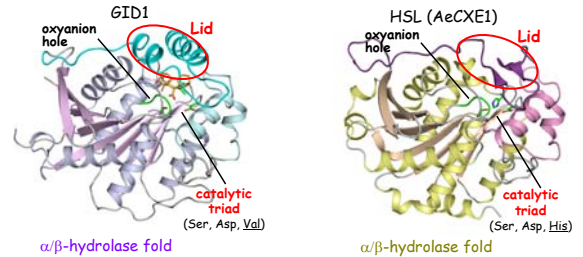


島田麻子¹、上口(田中)美弥子¹、中津亨²、中嶋正敏³、直江洋一²、大宮博子¹、加藤博章²、松岡信¹
 (1名大・生物機能研究センター、²京大院・薬、³東大院・農生科生化)

GID1 全体構造とリパーゼとの比較



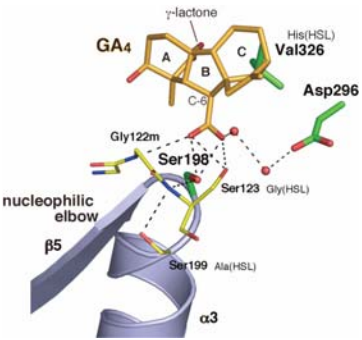
GAが存在しない場合、SLR1はGA反応を抑制している。一方、GAが存在すると、GA受容体であるGID1がGAを受け取り、SLR1と結合する。すると、SLR1はSCF^{E3DB2}によりユビキチン化され、26Sプロテアソームを介して分解される。その結果、抑制が解除され、GA反応が開始される。



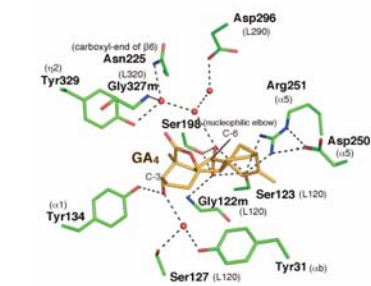
GID1はそのアミノ酸配列の相同性から予想されたように、HSLと似た立体構造だった。基本構造はα/b-hydrolase構造と呼ばれる構造をとっていた(GID1で紫とピンクの部分、HSLで黄色と茶色の部分)。また、HSLで活性中心となるcatalytic triadとoxyanion holeと呼ばれるモチーフも立体構造上に見られた。catalytic triadを形成する3つのアミノ酸、S、D、Hが、GID1では、S、D、Vに変わっていた。さらに、N末端側に、lidと呼ばれる、活性中心をおおうフタになる部分を有していた。

HSLの基質認識部位へGAが結合していた

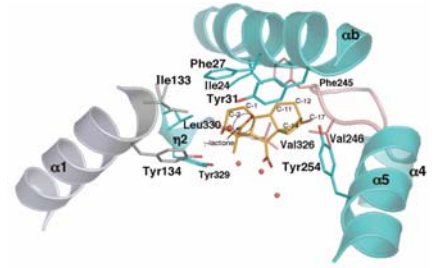
GAの結合様式



GAはHSLの基質結合部位だったところに結合していた。GAのC6カルボキシル基やガンマラク톤環に対しGID1はHSLの活性中心にあたるcatalytic triad(緑色)、oxyanion holeモチーフ(黄色)をうまく利用し親水性相互作用や疎水性相互作用を形成していた。このC6カルボキシル基やガンマラク톤は活性型のジベレリンの特徴として知られている。

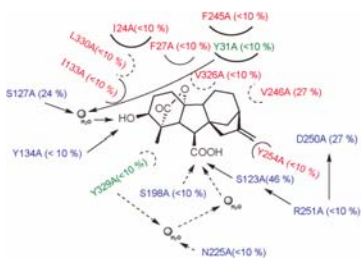


活性中心での相互作用の他に、活性型GAの特徴であるC3ヒドロキシル基やC6カルボキシル基と直接、ないしは水を介した間接的な水素結合ネットワークの形成が見られた。一方でガンマラク톤との水素結合は見られなかった。



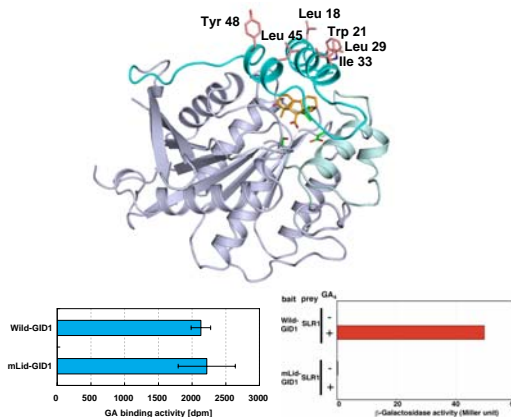
GAと疎水性相互作用をしている残基を示す。これらをまとめると下側を親水性の相互作用でつなぎとめるとあわせて、横や上から疎水性の相互作用をすることで、GAと結合できることが分かった。

GA結合ポケット近傍のアミノ酸をAlaに置換するとGA結合活性が低下した



構造上GA結合に関与している残基をアラニンに置換した変異GID1を用いて、GA結合活性(WTを100%としたときの比)を測定した。赤が疎水性、青が親水性、緑が両方の結合様式を示している。これらの残基がGA結合に重要であることがVitroで確認できた。

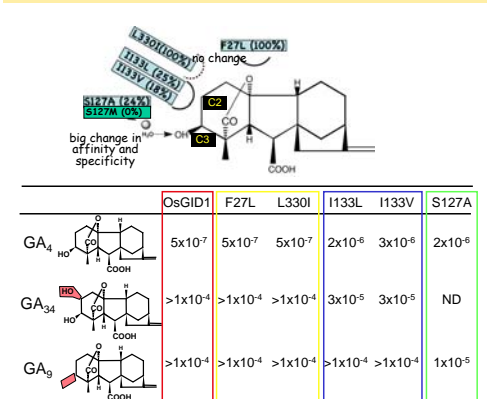
Lid外側の疎水性の残基とSLR1結合能



Lidの内側の残基がGAと相互作用すると、Lidが閉じた状態になりLeu18, Trp21, Leu29, Ile33, Leu45, Tyr48,等の疎水性残基がLidの外側に位置するようになる。GAが存在しない場合はGID1はSLR1と結合しないことが知られており、これらの残基をSLR1が認識することによりGA-GID1はSLR1と結合できることが示唆された。

Lid表面の6アミノ酸を全てアラニンに置換した変異体(mLid-GID1)に対しGA結合能とSLR1結合能を測定した。mLid-GID1はGA結合能は有しているが、SLR1とは結合しないことが確認できた。このことからLid表面の疎水性残基がSLR1との結合に重要であることが示唆された。

イネとシダの比較によるGID1進化の考察



イネGID1でGA結合に関与する残基のうちシダのものに置き換えた変異体を作成し、イネGID1のGA₃₄, GA₉(いずれも不活性型GA)への結合と比較した。F27L, L330I,は変化がみられなかった。I133L, I133VではGA₄に対する結合能が減少、GA₃₄に対する結合能が上昇。S127AではGA₄への結合が弱くなり、GA₉への結合が強くなった。これにより、シダGID1のジベレリンC2, C3水酸基の有無の認識のあいまいさがこれらの残基によるものであることを明らかにできた。また植物はHSLを起源としGA受容体であるGID1を獲得、さらに進化の過程において活性型GAへの特異性を確立してきたものと考えられる。