

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04907

研究課題名(和文) 構造に基づいた新規ジベレリン合成阻害剤の開発

研究課題名(英文) Structure-based Development of New GA Inhibitor

研究代表者

上口 美弥子(田中美弥子)(Ueguchi-Tanaka, Miyako)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：70377795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：植調剤であるプロヘキサジオン(PHX)は、ジベレリン(GA)の生合成酵素を阻害する事で作物を矮化させ、生産性を上げることを目的に広く利用されている。我々はGAの生合成酵素GA3-oxidase及び代謝酵素GA2-oxidaseを用いて、基質GA及びPHXとの共結晶構造を解明し、両酵素のそれらに対する反応性の違いを決定しているアミノ酸を推定した。これにより、GAの生合成から代謝経路までの一連の機構解明に向けた手がかりが得られ、今後は、両酵素それぞれに特異的な新規植調剤の開発につながる事が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物分野ではほとんど行われてこなかったタンパク質のX線結晶構造解析に基づいた構造活性相関(タンパク質化合物間相互作用)研究を行い、初めてGAの生合成及び代謝酵素と基質・植調剤との共結晶構造を明らかにした。これにより、阻害の作用機作ならびに構造と活性相関関係が明らかになりつつあるとともに、新たな植調剤の創生や植物分子育種の方法の開発につながる事が予想され、今後の農業の新しい展開において、必ずや有意義な知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The plant growth regulator, prohexadione (PHX) is widely used in agronomic and horticultural crops to reduce unwanted longitudinal shoot growth without lowering plant productivity by inhibiting gibberellin (GA) biosynthesis enzyme.

We elucidated the co-crystal structure with the substrates GA and PHX using the GA biosynthetic enzyme, GA3-oxidase and the metabolic enzyme, GA2-oxidase, and estimated the amino acids that determine the difference in reactivity of both enzymes towards them. This will provide clues for elucidation of a series of mechanisms from GA biosynthesis to metabolic pathways, and it can be expected that it will lead to the development of novel plant growth regulator specific to both enzymes in the future.

研究分野：ゲノム農学

キーワード：ジベレリン プロヘキサジオン 阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンのひとつであるジベレリン(GA)は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。GA生合成経路の後半段階においてはGA20-oxidase(GA20ox)およびGA3-oxidase(GA3ox)が、代謝経路ではGA2-oxidase(GA2ox)が働いており、いずれも2-オキソグルタル酸(2OG)要求性酸化酵素(2ODD)に属する酵素である。これら酵素群の阻害剤として植物成長調整剤であるプロヘキサジオンが知られており、主にGA3oxを阻害することで作物を矮化させ、生産性を上げることを目的に広く利用されている。しかしながら申請者らはこれまでに、プロヘキサジオンがイネのGA合成経路上の最終酵素であるGA3oxのみならず、GAの代謝酵素であるGA2oxに対しても阻害効果を示すという結果を得ている。このことは、本植調剤が、伸長を抑制する一方で(GA3oxの抑制)矮化も抑制(GA2oxの抑制)していることを示す。従って、効果的な植調剤の利用のためには、構造生物学的アプローチによる特異性を上げた阻害剤の開発が重要であると考えられるが、植物の分野で構造解析と植物調節物質の開発を目指したものはほとんどないのが現状である。また作用機構に関しても、in vitroでの実験報告は少なく、その阻害機構は解明されていない。

### 2. 研究の目的

植調剤であるプロヘキサジオンは、GAの生合成酵素を阻害する事で作物を矮化させ、生産性を上げることを目的に広く利用されている。しかしながら、本植調剤は、GA代謝酵素も同時に阻害するため、阻害剤として更なる改良が望まれる。そこで本課題は、プロヘキサジオンの改良を通して、結晶構造解析結果に基づいた新規植調剤の開発や新たな分子育種の方法の可能性を探るとともに、植物における新たな研究分野 - タンパク質のX線結晶構造解析に基づいた構造活性相関(タンパク質化合物間相互作用)研究 - を提示することを目的とする。更に、新規植調剤のターゲットとなるGA合成ならびに代謝酵素の理解を深め、阻害の作用機作ならびに構造と活性相関関係の解明に繋がると期待できる。

### 3. 研究の方法

- (1) イネにおけるGA生合成酵素GA3ox2ならびに不活化酵素GA2ox3について、基質または阻害剤であるプロヘキサジオン存在下でX線結晶構造解析を行う。
- (2) 得られた構造解析結果からそれぞれの構造比較を行い、基質や阻害剤の結合部位及びその相互作用を解明する。
- (3) 変異体タンパク質の構造や活性、ロックアウト変異体イネの変異形質の解析等を通して、植物におけるそれぞれのタンパク質の構造活性相関研究を行い、これらのデータに基づき、新規阻害剤の開発を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) GA2ox3とGA3ox2の間の構造活性相関

イネGA生合成酵素GA3ox2は、基質であるGA<sub>9</sub>存在下で得られた結晶を放射光施設SPring-8にて測定し、1.9 Åまでのデータを用いて共結晶構造を決定した。以前我々が明らかにした不活化酵素GA2ox3と全体構造を比較したところ、GA2ox3はS-S結合で結合したダイマー同士が相互作用した4量体を形成していたのに対し、GA3ox2は単量体であった(図1)。また、両酵素の活性中心にも大きな違いが見られ、GA3ox2の基質であるGA<sub>9</sub>はGA2ox3の基質であるGA<sub>4</sub>とは異なる位置、上下反対向きに結合していた。これにより、両酵素の反応性の違いを決定しているアミノ酸を同定でき、GAの生合成から代謝経路までの一連の機構解明に向けた手がかりが得られた。

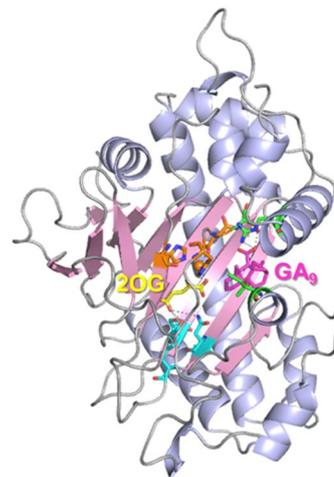


図1 GA3ox2とGA<sub>9</sub>の共結晶構造

#### (2) GA2oxとGA3oxの構造と阻害剤に対する阻害活性相

関

GA2ox3 ならびに GA3ox2 とプロヘキサジオンおよび基質 GA との共結晶化を試みた。現在のところ、GA2ox3 については、植調剤 PHX 存在下で得られた結晶を放射光施設 SPring-8 にて測定し、2.9 Å までのデータを用いて構造解析に成功した (図 2)。これまでに得た GA との共結晶構造と同様に、全体構造は 4 量体を形成していた。一方、活性中心ではプロヘキサジオンが 2OG の結合場所に結合していたことから、プロヘキサジオンは 2OG と拮抗的に働き GA2ox3 を阻害していることが示唆された。この結果は、阻害活性測定の結果と一致している。

GA3ox2 については、結晶は得られているもののまだ構造解析には至っていないが、GA<sub>9</sub> との共結晶構造の結果を用いたシミュレーションによりプロヘキサジオンとの結合を調べた。その結果、プロヘキサジオンに対する GA2ox 及び GA3ox の阻害様式の違いは、プロピオン基と周辺残基 (Leu または Phe) の疎水性相互作用、また六員環と ILE の相互作用などが大きな違いになる事が示唆された。これらの結果により、今後、両酵素それぞれに特異的な植調剤の開発につながる事が期待できる。

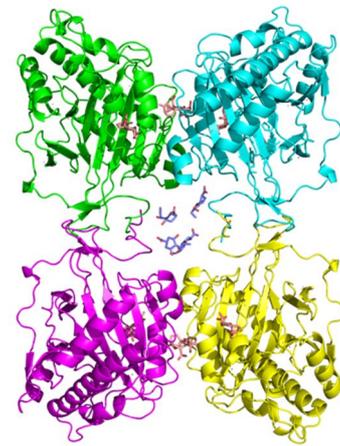


図2 GA2ox3とプロヘキサジオンの共結晶構造

### (3) GA2ox3 の 4 量体形成・活性相関と 4 量体形成のイネにおける意義

これまでに我々は、GA2ox3 の全体構造は S-S 結合で結合したダイマー同士が相互作用して 4 量体を形成し、興味深いことに、基質である GA<sub>4</sub> が活性中心以外にも酵素分子間に水素結合を介して結合していることを明らかにした。そこで、イネにおける GA2ox3 の 4 量体形成の生理学的意味を明らかにし、植調剤のターゲットである GA 不活化酵素に関する新たな知見を得ることを目的に、多量体形成と活性との関係を調べた。

ゲルろ過解析や BiFC 解析により、in vitro と同様に in planta でも多量体構造をとっており、GA<sub>4</sub> の有無により可逆的に 4 量体を形成することも明らかにした。さらに、ゲルろ過で単量体及び 4 量体を単離し、各分子の酵素活性を調べたところ、GA<sub>4</sub> を介した 4 量体は単量体に比べ酵素反応速度がはるかに速いことが分かった。また、植物内での機能を調べるため、4 量体形成に重要なアミノ酸を変異させたプラスミドを、CRISPR/Cas9 システムによって得たノックアウト変異体に形質転換させ、その形質を調査した。プロモーターGUS による発現解析により、GA2ox3 は節間伸長の抑制や分裂組織での制御に関わる事が示唆されたことから、主に節間長に着目し Wild-type と変異体を比較した。その結果、Wild-type では活性が回復して節間伸長が抑制されたのに対し、変異体では節間長が Wild-type よりも長く活性が回復しなかった。これらの結果により、GA2ox3 は以前から知られているような遺伝子発現調節だけでなく、GA<sub>4</sub> 濃度が上昇すると多量体構造を形成して活性を上げ、GA 代謝を促進するといった、タンパク質レベルでの調節も行うことが示唆され、GA 不活化酵素の植物内での新たな調節機構を見出した。

### (4) GA2ox3 の活性メカニズムの解明

GA2ox3 の 4 量体形成・活性相関については当初の計画より順調に進み、分子動力学シミュレーションによる蛋白質のダイナミクスを解析することができた。その結果、活性部位を覆う蓋のようなβシートの開閉や、分子間での相互作用による蓋の安定性が反応速度に寄与することが明らかとなった。さらに反応に関与するアミノ酸も特定する事ができ、変異体による酵素活性測定などにより、GA 濃度が上昇すると分子間に GA が結合して多量体を形成し、分子間での相互作用による安定化によって酵素反応速度を上げて GA 代謝を促進している機構が示唆された

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hirano, K., Yoshida, H., Aya, K., Kawamura, M., Hayashi, M.,Hobo, T., Sato-Izawa, K., Kitano, H.,

Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. (2017) Small Organ Size 1 and Small Organ Size 2/Dwarf and Low TILLERING form a Complex to Integrate Auxin and Brassinosteroid Signaling in Rice. Mol Plant. 10, 590-604. 査読有, doi: 10.1104/pp.17.00301

〔学会発表〕(計 7 件)

国際学会

Ueguchi-Tanaka M. “Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway.”, 22th IPGSA Meeting, 2016 年, Tronto, Canada

Yoshida H., Hirano K., Matsuoka M., Ueguchi-Tanaka M. “DELLA, IDD and SCL3 cooperate in the gibberellin feedback system”, 22th IPGSA Meeting, 2016 年, Tronto, Canada

Kawai K., Takehara S., Matsuoka M., Ueguchi-Tanaka M. “Gibberellin 3-oxidase 1 is essential for pollen maturation in Rice”, 22th IPGSA Meeting, 2016 年, Tronto, Canada

Takehara S., Mikami B., Kawai K., Matsuoka M., Ueguchi-Tanaka M. “Structural and functional analysis of gibberellin 2-oxidase in rice”, 22th IPGSA Meeting, 2016 年, Tronto, Canada

国内学会

尾原寛之、竹原清日、三上文三、松岡信、上口(田中)美弥子 “GA 合成・代謝酵素と阻害剤との共結晶化の試み” 日本農芸化学会 2019 年度大会、東京

杉原諒彦、竹原清日、松岡信、上口(田中)美弥子 “植物ホルモ関連因子の結晶構造解析に向けた試み” 日本農芸化学会 2019 年度大会、東京

竹原清日、三上文三、桜庭俊、松岡信、上口(田中)美弥子 “MD シミュレーションにより明らかとなったイネジベレリン代謝酵素の活性機構” 日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋

〔図書〕(計 3 件)

Takehara S, Ueguchi-Tanaka M., Springer, Plant Structure Biology., 2018, 83-95.

上口(田中)美弥子、中嶋正敏、講談社、植物ホルモンの科学第 3 版、2016, 37-52

吉田英樹、上口(田中)美弥子、エヌ・ティー・エス、生物の科学 遺伝、2016, 361-365

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三上 文三

ローマ字氏名：(MIKAMI, bunzo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。