

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03272

研究課題名(和文)植物ホルモンの代謝系に保存された単量体 多量体スイッチングシステム

研究課題名(英文)Switching between monomeric and multimeric is a conserved system in plant hormone metabolism.

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・教授

研究者番号：70377795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：成長するかしないのかの決定は、植物にとって大きな選択である。いくつかの植物ホルモンは、生合成、代謝、シグナル伝達、輸送体等の調節を通じて巧妙に成長を制御している。

代謝酵素であるイネGA2酸化酵素(GA2ox3)は、可逆的にジベレリン(GA)濃度依存的な多量体形成と活性増大化を引き起こしていた。本研究では、オーキシンの代謝酵素も同様な制御があることを証明した。さらにイネの花粉中のGA3酸化酵素(GA3ox1)は、花粉成熟過程において特殊なGA7合成に関わり、野生イネからの進化を通じて花粉への発現の局在性と高い反応性を獲得することで、成長に影響することなく花粉成熟に関わるように進化していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長するかしないのかの決定は、植物にとって大きな選択である。いくつかの植物ホルモンは、生合成、代謝、シグナル伝達、輸送体などの調節を通じて巧妙に成長を制御している。

本研究は、特に植物の成長に重要なジベレリンとオーキシンの代謝酵素や生合成酵素の構造や活性、輸送体の同定と機能についてイネを中心に解析したものである。特に、これらに対してX線結晶構造解析を行なったことは今まで報告が無く、極めてユニークである。従って、今回得られた結果は、今後の農業上の新たな展開において植物の成長制御に重要な知見をあたえるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)："To grow or not to grow" is a very important decision for plant survival. Several plant hormones precisely control growth through regulation of biosynthesis, metabolism, transport and signal transduction.

The metabolic enzyme rice GA2-oxidase3 (GA2ox3) reversibly causes gibberellin (GA) concentration-dependent multimerization and activity enhancement. In this study, we demonstrated that auxin-metabolizing enzymes are similarly regulated.

Furthermore, GA3-oxidase1 (GA3ox1) in rice pollen was involved in specialized GA7 synthesis during pollen maturation and evolved to be involved in pollen maturation without affecting growth by acquiring localization of expression and high responsiveness in pollen through evolution from wild rice.

研究分野：植物ホルモン

キーワード：植物ホルモン ジベレリン オーキシン 多量体化 糖輸送体 花粉成熟 イネ 幼葉鞘伸長

## 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。我々は、イネ変異体を用いてGAの生合成、シグナル伝達を明らかにするとともに、それらの因子や複合体を構造解析することにより、より詳細な機構を解明したいと考えてきた。

イネのGA代謝酵素であるGA2ox3について、結晶化し構造解析を行ったところ、OsGA2ox3が4量体を形成しており、サブユニット間には活性中心にあるGAとは別なGAが結合していることが解った。4量体形成には、このサブユニット間のGAが必須であり、GAに依存した多量体形成に伴い酵素活性がシグモイダルに上昇した。さらに、MDシミュレーションにより、多量体になると酵素分子間にあるGAが次の反応のための基質として活性ポケットに転がり込むことが可能となり、反応速度論的に反応性が上昇することが示された。このシステムが合成酵素であるOsGA3ox2には無く、OsGA2ox3にのみ見られたことは極めて合目的であり、活性型GAが多くなると4量体を作り代謝活性を上昇させると説明できた。この、いわゆるアロステリック反応性の変化には、サブユニット間のGAの結合に関わる308番目のリジン残基(K308)が、必須であった。

本研究では、他の20DDのグループにオーキシンの代謝酵素であるDAOに注目し、DAOにも、OsGA2ox3と同様なオーキシン依存的な多量体形成による酵素活性調節機構があるかどうかを明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、オーキシンの代謝酵素DAOにも、OsGA2ox3と同様な基質依存的な多量体形成による酵素活性調節機構があるかどうかを反応機構の解析と構造解析結果を通して明らかにするとともに、いくつかの成長に関わる植物ホルモンが、このような調節機構を独立かつ共通に進化させたかどうかについての問いに応えようとするものである。本研究は、植物ホルモンの代謝酵素が植物ホルモンによって従来言われてきたような転写レベルでのフィードバック調節だけでなく、タンパクレベルでも調節機構があることを示そうとするものである。このような調節は、古くは、モノのアロステリック酵素として提唱されていた概念であるが、そのシステムが成長に関わる植物ホルモンの可逆的調整システムとして進化の中で何回か独立して誕生したということの意味する。

## 3. 研究の方法

本研究では、オーキシンの代謝酵素であるDAOに関しても、タンパク質レベルでオーキシン依存的な単量体⇌多量体による活性制御が存在しているのかを明らかにすることにある。そのために、以下の実験を行った。

(1) イネからDAO遺伝子を単離し、リコンビナントタンパク質として発現させ、オーキシン量依存的に*in vitro*での多量体形成、活性増大が見られるかどうかを調べた。同時に、OsGA2ox3のK308に対応する塩基性アミノ酸がこの調節に関わっているのかについて検証した。

(2) イネDAOのオーキシンとの共結晶を作製し、X線結晶構造解析により構造を決定した。その構造の中にサブユニット間のオーキシンや、K308に対応する塩基性アミノ酸が多量体形成や活性にどのような効果を持つのかを解析した。

(3) もし、DAOがオーキシンに依存した単量体⇌多量体形成により活性制御されているならば、

成長に関わる主要な植物ホルモンである、ジベレリンとオーキシン2つが20DDファミリー酵素中にある、ある塩基性アミノ酸を利用して、複数回このようなアロステリック酵素としての制御機構を獲得したと言える。その進化の可能性について検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) OsDAOの結晶構造解析

近年の研究において、IAAを不活化するDAOは、オーキシンの恒常性を調節するのに重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。興味深いことに、すべてのDAOにおいて、GA<sub>4</sub>依存的な多量体化と活性化に必須なOsGA2ox3の308番目の残基に対応するアミノ酸がArgもしくはLysで保存されていた。したがって、DAOの活性もまたIAAを介する多量体化によって制御されている可能性が考えられた。我々は、OsDAOの結晶構造を基質であるIAAとともに、2.0 Åの解像度で解析した。OsDAOは20DDの典型的な構造を有し(図1a)、2量体を形成していた。2量体の境界面には、2つのIAA分子が存在していた(図1b)。1つのサブユニットA上にあるIAA(緑色で示す)は、サブユニットAのR154とS176とサブユニットBのR282と結合し、もう一方のサブユニットB上にあるIAA(シアン色で示す)は、サブユニットBのR281、R290とS176とサブユニットAのR282と結合していた。さらに、D278、D279、R281とR282を介してお互いに水素結合でも結合していた(図1c)。IAA存在下、非存在下で、ゲル濾過を行ったところ、IAA存在下では2量体形成が見られた一方で、非存在下では見られなかった(図1d)。植物体内での多量体化は、BiFCの解析により示された(図1e)。反応速度論的解析を行ったところ、2量体のOsDAOは単量体に比べ約5倍低いIAAに対するK<sub>m</sub>値を示した一方で、多量体のV<sub>max</sub>は単量体に比べ約22倍高い値を示した(図1f)。これらの結果は、オーキシンの不活化酵素DAOがGA2oxと同様なメカニズム、すなわち『基質を介した多量体化』で制御されていることを示唆するものであった。

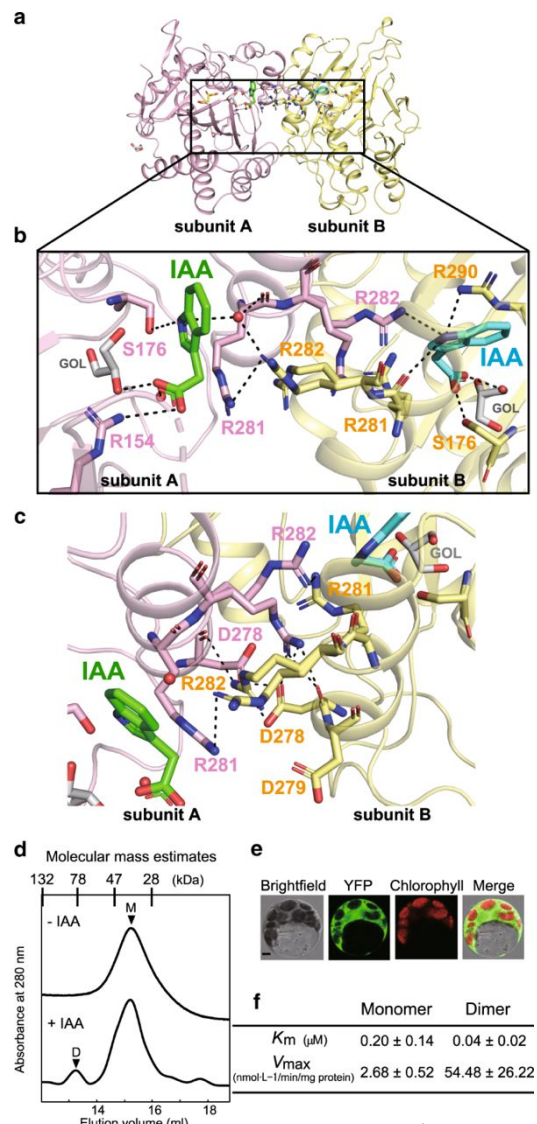


図 1. OsDAO は、IAA を仲介するダイマー構造を形成し、酵素活性を増大させる

##### (2) 20DD酵素の系統樹解析

20DD酵素の系統樹解析を行った。C19、C20型GA2oxsとDAOはそれぞれ別なクレードに分類された(図2a)。さらに、これらの酵素には別なクレードであるにも関わらず、すべてにおいて多量体形成に重要と考えられるR/Kが保存されていた。このことは、これらの酵素はそれぞれ独自に進化した一方で、このR/Kが機能に重要であり、アミノ酸と機能が保存されてきた可能性を示唆している(図2a)。系統樹解析は、C19型のGA2oxが、種子植物になって誕生したことを示している。なぜならば、C19-GA2oxは裸子植物のトウヒ(*P. abies*)には存在しているものの、シダ類

である*S. moellendorffii*やコケ類である*P. patens*においては見出されなかったからである。一方、C20型のGA2oxやDAOは被子植物の時代になって誕生したと考えられた(図2b)。

### (3) GA2oxsおよびDAOの多量体形成による活性化

以上のように、OsGA2ox3もOsDAOも基質を介して、多量体形成することで活性を増大していることが明らかになった(図2c)。また、この酵素と酵素の間に可逆的に嵌った基質の結合には、KまたはRが使われていた。この塩基性アミノ酸は、このような制御を行う植物ホルモン不活化酵素の調節に、独立かつ保存的に使われてきたと推察できる(図2a,c)。このような小分子による構造変化と活性変化は、モノーが提唱した典型的なアロステリック効果とも言える。このモデルに当てはめると、OsGA2ox3やOsDAOの活性化は次のように説明できる。すなわち、GA<sub>4</sub>やIAAの濃度が低い時には、これらの酵素はモノマー構造をとり、活性は低い。基質濃度が増加するに従って酵素は基質それ自体を介して多量体を形成し、活性化することでGAやIAAを不活化し、これら植物ホルモンの恒常性が維持されるというものである。

### (4) GAトランスポーターの同定

ついで、今まで明らかとなっていなかったイネにおけるGA輸送についてin vitro (Y2Hや発現解析) およびin planta (形質転換体イネを用いた形質調査) で検証し、糖輸送体であるSWEETタンパク質の一つであるSWEET3aがグルコースとともにGAを輸送し、イネの初期成長を微調整することを明らかにした。

### (5) イネの花粉特異的なGA3ox1の解析

また、ジベレリン生合成酵素であるイネGA3ox1が、イネの花粉の中でgametophyticに発現し、大量のGA<sub>7</sub>およびGA<sub>4</sub>を合成していることを明らかにした。GA<sub>7</sub>は、GA2ox型の不活化酵素が働けない強力な活性型GAであり、一方、GA<sub>4</sub>は受容体GID1の結合性が最も強い強力な活性型GAである。我々は、イネGA3ox1のノックアウト変異体を作成し、その表現型から、本酵素がイネの花粉の後期成熟と花粉管伸長に重要な機能を持つことを示した。このGA3ox1の反応特異性と発現局在性は、イネの進化の中で野生イネの祖先から徐々に獲得したことをX線結晶構造解析と機能解析により明らかにした。逆に、イネのシュート成長に関わる合成酵素GA3ox2と花粉で働くGA3ox1が発現場所を厳密に分けるように進化したことが、正常なシュート伸長制御とイネの早い花粉管伸長速度の両立を可能にしたと考えられる。さらに、このことは、現在の育種イネの原型となったAAゲノム野生イネが、世界で最も繁栄してきたことの一つの原因として説明できるのかもしれない。

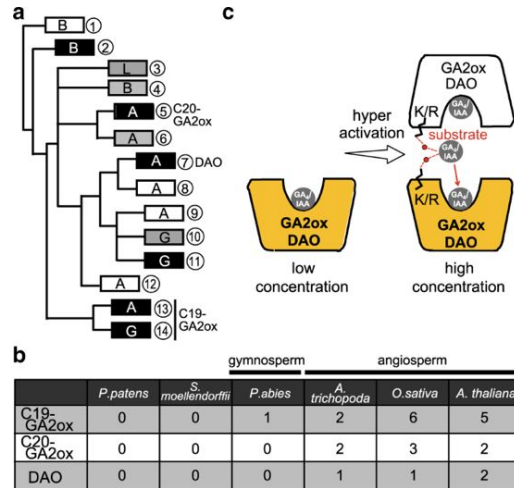


図 2. OsGA2oxs と OsDAO の系統樹解析と活性化のモデル

a, 2ODD 酵素の系統樹解析。コケ、シダ、裸子、被子植物由来のものをそれぞれ、B、L、G、A で表している。また、多量体形成に重要な GA2ox3 の 308 番目のアミノ酸に対応する R/K を持っているものを黒、持っていないものを白の四角で表し、両方が含まれるものを灰色の四角で示した。b. 各酵素遺伝子の数。c. 活性化モデル。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawai Kyosuke, Takehara Sayaka, Kashio Toru, Morii Minami, Sugihara Akihiko, Yoshimura Hisako, Ito Aya, Hattori Masako, Toda Yosuke, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Furuumi Hiroyasu, Nonomura Ken-ichi, Mikami Bunzo, Akagi Takashi, Sakakibara Hitoshi, Kitano Hidemi, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 5
2. 論文標題 Evolutionary alterations in gene expression and enzymatic activities of gibberellin 3-oxidase 1 in <i>Oryza</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03008-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takehara Sayaka, Sakuraba Shun, Mikami Bunzo, Yoshida Hideki, Yoshimura Hisako, Itoh Aya, Endo Masaki, Watanabe Nobuhisa, Nagae Takayuki, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 11
2. 論文標題 A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16068-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morii Minami, Sugihara Akihiko, Takehara Sayaka, Kanno Yuri, Kawai Kyosuke, Hobo Tokunori, Hattori Masako, Yoshimura Hisako, Seo Mitsunori, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 61
2. 論文標題 The Dual Function of OsSWEET3a as a Gibberellin and Glucose Transporter Is Important for Young Shoot Development in Rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1935 ~ 1945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上口(田中)美弥子
2. 発表標題 植物ホルモン応答機構の分子基盤(日本農芸化学会賞受賞講演)
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤詩織, 河合恭甫, 上口(田中)美弥子, 大井崇生
2. 発表標題 X線マイクロCTを用いたイネの開花前と開花中の鱗被の形態解析
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉原 諒彦、大井 崇生、竹原 清日、服部 将子、松岡 信、上口(田中) 美弥子
2. 発表標題 ジベレリンによるイネ葉鞘伸長の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyosuke Kawai, Sayaka Takehara, Toru Kashio, Minami Morii, Akihiko Sugihara, Hisako Yoshimura, Aya Ito, Masako Hattori, Yosuke Toda, Mikiko Kojima, Yumiko Takebayashi, Hiroyasu Furuumi, Ken-ichi Nonomura, Bunzo Mikami, Takashi Akagi, Hitoshi Sakakibara, Hidemi Kitano, Makoto Matsuoka, Miyako Ueguchi-Tanaka
2. 発表標題 Evolutionary analyses of gene expression and enzymatic activities of gibberellin 3-oxidase 1 in Oryza
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹原清日、桜庭俊、三上文三、松岡信、上口(田中)美弥子
2. 発表標題 Homeostatic inactivation of gibberellin and auxin is regulated by the same allosteric mechanism.
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉原 諒彦、森井 南美、竹原 清日、菅野 裕理、河合 恭甫、保浦 徳昇、服部 将子、吉村 久子、瀬尾 光範、上口(田中) 美弥子
2. 発表標題 イネにおけるジベレリン輸送体の同定
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学 生物機能開発利用研究センター <a href="http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp">http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp</a> 生物産業創出研究室(上口グループ) <a href="https://bioindustry.wixsite.com/ueguchilab">https://bioindustry.wixsite.com/ueguchilab</a>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------